



# भारत का राजपत्र

## The Gazette of India

असाधारण

## EXTRAORDINARY

भाग II—खंड ३—उप-खंड (ii)

PART II—Section 3—Sub-section (ii)

प्राप्तिकार से प्रकाशित

PUBLISHED BY AUTHORITY

सं. 276।  
No. 276।नई दिल्ली, शुक्रवार, मार्च 24, 2006/चैत्र 3, 1928  
NEW DELHI, FRIDAY, MARCH 24, 2006/CHAITRA 3, 1928कृषि बंत्रालय  
(कृषि और सहकारिता विभाग)

आवश्यक

नई दिल्ली, 24 मार्च, 2006

का.आ. 391(अ).—केन्द्रीय सरकार, आवश्यक वस्तु अधिनियम, 1955 (1955 का 10) की धारा 3 द्वारा प्रदत्त शक्तियों का प्रयोग करते हुए, उर्वरक (नियंत्रण) आदेश, 1985 का और संशोधन करने के लिए निम्नलिखित आदेश करती है, अर्थात् :-

1. (1) इस आदेश का संक्षिप्त नाम उर्वरक (नियंत्रण) संशोधन आदेश, 2006 है।  
 (2) यह राजपत्र में प्रकाशन की तारीख को प्रवृत्त होगा।
2. उर्वरक (नियंत्रण) आदेश, 1985 (जिसको इसमें इसके पश्चात उक्त आदेश कहा गया है) के खंड 2 में :-  
 (क) उप-खंड (क) के पश्चात् निम्नलिखित उप-खंड अंतःस्थापित किया जाएगा, अर्थात् :-  
 "(कक) - जैव उर्वरक से अभिप्रेत ऐसा याहक आधारित (ठोस अथवा द्रव जीवित सूक्ष्म अवयव अन्तर्विष्ट उत्पाद है जो मृदा और/अथवा फसल की उत्पादकता बढ़ाने के लिए नाइट्रोजन निर्धारण, फोस्फोरस घुलनशीलता अथवा पोषक संघटन आदि के रूप में कृषि की दृष्टि से उपयोगी है।"  
 (ख) उप-खंड (ज) में, "तथा उर्वरकों के विशेष मिश्रण" शब्दों के के स्थान पर, ", उर्वरक का विशेष मिश्रण, अनुसूची 3 में विनिर्दिष्ट जैवउर्वरक और अनुसूची 4 में विनिर्दिष्ट कार्बनिक उर्वरक" शब्द रख जाएगे;  
 (ग) उप-खंड 'ग' के पश्चात् निम्नलिखित उप-खंड अंतःस्थापित की जाएगी, अर्थात् :-

"(ण) - कार्बनिक उर्वरक से अभिप्रेत ऐसे किसी जैविक प्रकृति (पौधा/पशु) के एक अथवा अधिक अप्रसंस्कृत सामग्री (सामग्रियों) से बने पदार्थ हैं और इनमें अप्रसंस्कृत खनिज सामग्रियां सम्मिलित हो सकती हैं जिन्हें सूक्ष्मजैविकीय अपघटन पद्धति के माध्यम से परिवर्तित किया गया है।"

(घ) उप-खण्ड (थ) में मद संख्या (iii) के पश्चात्, निम्नलिखित अंतःस्थापित जाएगा अर्थात् :-

"(iv) - अनुसूची 3 के भाग क के स्तम्भ 1 में सम्मिलित किसी जैवउर्वरक के संबंध में, उस अनुसूची के भाग ख में यथा विनिर्दिष्ट अनुज्ञेय भिन्नता की सीमाओं के अधीन रहते हुए स्तम्भ 2 में तत्स्थानी प्रविष्टि में निर्धारित मानक" ;

"(v) अनुसूची - 4 के भाग क के स्तम्भ 1 में सम्मिलित किसी कार्बनिक उर्वरक के संबंध में उस अनुसूची के भाग ख में यथा विनिर्दिष्ट अनुज्ञेय भिन्नता की सीमाओं के अधीन रहते हुए स्तम्भ 2 में तत्स्थानी प्रविष्टि में निर्धारित मानक" ;

3. उक्त आदेश के अध्याय शीर्षक "5. उर्वरकों के मिश्रण का विनिर्माण" के स्थान पर, अध्याय शीर्षक "5 उर्वरकों, कार्बनिक उर्वरकों और जैवउर्वरकों के मिश्रण का विनिर्माण" रखा जाएगा ।

4. उक्त आदेश के खण्ड 12 में "या उर्वरक के विशेष मिश्रण" शब्दों के स्थान पर "उर्वरक, जैवउर्वरक या कार्बनिक उर्वरक के विशेष मिश्रण" शब्द रखे जाएंगे ।

5. उक्त आदेश के खण्ड 13 में उप-खण्ड (1) के स्थान पर निम्नलिखित रखा जाएगा, अर्थात्:-

"(1) - इस आदेश के अन्य उपबंधों के अधीन रहते हुए -

(क) कोई भी व्यक्ति, उर्वरकों के किसी भी मिश्रण, चाहे इस आदेश की अनुसूची - 1 के भाग क में विनिर्दिष्ट ठोस या तरल उर्वरक हों, तब तक विनिर्माण नहीं करेगा जब तक कि ऐसा मिश्रण राजपत्र में राज्य सरकार द्वारा जारी की जाने वाली अधिसूचना में निर्धारित मानकों के अनुरूप न हो ;

(ख) कोई भी व्यक्ति किसी जैव-उर्वरक का विनिर्माण नहीं करेगा जबतक कि ऐसा जैव उर्वरक अनुसूची - 3 के भाग क में निर्धारित मानकों के अनुरूप न हो ;

(ग) कोई भी व्यक्ति किसी कार्बनिक-उर्वरक का विनिर्माण नहीं करेगा जबतक कि ऐसा कार्बनिक उर्वरक अनुसूची - 4 के भाग क में निर्धारित मानकों के अनुरूप न हो ।"

6. खण्ड 14 के उप-खण्ड 2 के पश्चात्, निम्नलिखित उप-खण्ड अंतःस्थापित किया जाएगा, अर्थात् :-

"(3) कार्बनिक उर्वरक अथवा जैव-उर्वरक के तैयार करने के लिए विनिर्माण का प्रमाणपत्र प्राप्त करने की इच्छा रखने वाला प्रत्येक व्यक्ति प्ररूप घ में, दो प्रतियों में एक आवेदन, खण्ड 36 के अधीन उसके लिए निर्धारित शुल्क के साथ रजिस्ट्रीकरण प्राधिकारी को देगा।"

#### 7. उत्तर आदेश के खण्ड 15 में :-

- (i) शीर्षक के स्थान पर निम्नलिखित रखा जाएगा अर्थात् :- "उर्वरकों, जैव उर्वरकों अथवा कार्बनिक उर्वरकों के मिश्रण तैयार करने के लिए विनिर्माण के प्रमाणपत्र का प्रदान किया जाना या नामजूर किया जाना" शब्द रखे जाएंगे;
- (ii) उप-खण्ड (1) में "उर्वरकों के मिश्रण" शब्दों के पश्चात्, "जैव उर्वरक, कार्बनिक उर्वरक के मिश्रण" शब्द अंतःस्थापित किए जाएंगे।
- (iii) उप-खण्ड (2) में "उर्वरकों के मिश्रण" शब्दों के पश्चात् "उर्वरकों, जैव उर्वरकके मिश्रण" शब्द अंतःस्थापित किए जाएंगे।

#### 8. उत्तर आदेश के खण्ड 17 में :-

- (i) शीर्षक में "उर्वरक के मिश्रण" शब्दों के बाद "बायोउर्वरक अथवा जैव उर्वरक" शब्द जोड़े जाएंगे -
- (ii) "उर्वरक के मिश्रण" शब्दों के पश्चात् "जैवउर्वरक अथवा कार्बनिक उर्वरक के मिश्रण" शब्दअंतःस्थापित किए जाएंगे।

#### 9. उत्तर आदेश के खण्ड 18 में :-

- (i) शीर्षक में "उर्वरकों के मिश्रण को तैयार करने" शब्दों के पश्चात् "जैव-उर्वरकों, या कार्बनिक उर्वरकों के मिश्रण को तैयार करने" शब्द अंतःस्थापित किए जाएंगे;
- (x) उप-खण्ड 1 में, "उर्वरकों के मिश्रण" शब्दों के पश्चात् "जैवउर्वरक, या कार्बनिक उर्वरक के मिश्रण" शब्द अंतःस्थापित किए जाएंगे।

#### 10. उत्तर आदेश के खण्ड 21 में :-

- (i) 'उर्वरकों' शब्द तथा प्रतीक "उर्वरकों, जैव-उर्वरकों या कार्बनिक उर्वरकों" शब्द रखे जाएंगे;
- (ii) उप-पैरा (क) के पश्चात्, निम्नलिखित अंतःस्थापित किया जाएगा, अर्थात् :-

"(कक) प्रत्येक ऐसे आधान पर, जिसमें कोई जैव उर्वरक/कार्बनिक उर्वरक पैक किया जाता है, जैव उर्वरक/कार्बनिक उर्वरक शब्द स्पष्ट रूप से अंकित किए जाएंगे तथा जब तक कि किसी विधि के अधीन अन्यथा अपेक्षित न हो केवल वही और उस पर दिए जाएंगे जो इस बारे में नियंत्रक द्वारा समय-समय पर विनिर्दिष्ट किए गए हों।"

11. उक्त आदेश के खण्ड 27 के पश्चात्, निम्नलिखित खण्ड अंतःस्थापित किया जाएगा, अर्थात् :-

"27 ख जैव उर्वरक और कार्बनिक उर्वरक के लिए निरीक्षकों की नियुक्ति के लिए अहताएं - इस आदेश के अधीन जैव-उर्वरक और कार्बनिक उर्वरक के निरीक्षक के रूप में नियुक्ति के लिए कोई व्यक्ति पात्र नहीं होगा जबतक कि वह निम्नलिखित अहताएं धारण न करता हो, अर्थात् :-

(1) जिसमें रसायन शास्त्र/सूक्ष्म जीव विज्ञान एक विषय के रूप में सहित, कृषि अथवा विज्ञान में स्नातक ; और

(2) जैव उर्वरकों/कार्बनिक उर्वरकों के गुणवत्ता नियंत्रण के क्षेत्र में प्राणी। ए अथवा अनुभव ।

12. उक्त आदेश के खण्ड 28 में, उप-खण्ड 1 की प्रविष्टि (ख) के पश्चात्, निम्नलिखित प्रविष्टि अंतःस्थापित की जाएगी, अर्थात् :-

"(खक) अनुसूची 3 में अधिकथत नमूने लेने की प्रक्रिया के अनुसार किसी जैव-उर्वरक के नमूने ले सकेगा ।"

"(खख) अनुसूची 4 में अधिकथित नमूने लेने की प्रक्रिया के अनुसार किसी कार्बनिक-उर्वरक के नमूने ले सकेगा ।"

13. उक्त आदेश के खण्ड 29 में उप खण्ड (1) के पश्चात् निम्नलिखित उप-खण्ड अंतःस्थापित किए जाएंगे अर्थात् :-

"(1क) किसी निरीक्षक द्वारा लिए गए जैव-उर्वरक नमूनों का विश्लेषण, राष्ट्रीय जैव खेती केन्द्र, गाजियाबाद अथवा बंगलौर, भुदनेश्वर, हिसार, इम्फाल, जबलपुर और नागपुर स्थित क्षेत्रीय कार्बनिक खेती केन्द्रों या केन्द्रीय या राज्य सरकार द्वारा अधिसूचित किसी अन्य प्रयोगशाला में अनुसूची 3 में निर्धारित निर्देशों के अनुसार किया जाएगा ;

(1ख) किसी निरीक्षक द्वारा लिए गए कार्बनिक-उर्वरक नमूनों का विश्लेषण, राष्ट्रीय जैव खेती केन्द्र, गाजियाबाद अथवा बंगलौर, भुदनेश्वर, हिसार, इम्फाल, जबलपुर और नागपुर स्थित क्षेत्रीय जैव खेती केन्द्रों या केन्द्रीय राज्य सरकार द्वारा अधिसूचित किसी अन्य प्रयोगशाला में अनुसूची 4 में निर्धारित निर्देशों के अनुसार किया जाएगा" ।"

14. उक्त आदेश के खंड 30 में :-

- (क) उप-खंड (1) में "प्ररूप ठ में" शब्द और अक्षर के पश्चात्, निम्नलिखित अंतःस्थापित किया जाएगा, अर्थात् :- "में और कार्बनिक उर्वरकों और जैव उर्वरकों के मामले प्ररूप ठ 1 में";  
उप - खंड (2) में
- (ख) [ "प्ररूप ठ में" शब्द निम्नलिखित अंतःस्थापित किया जाएगा, अर्थात् :- "में और कार्बनिक उर्वरकों और जैव उर्वरकों के मामले में "प्ररूप ठ में"  
"और जैव उर्वरकों और बायो उर्वरकों के मामले में प्ररूप ठ 1 में"

15. उक्त आदेश की अनुसूची 2 के पश्चात् निम्नलिखित नई अनुसूचीयां अंतःस्थापित की जाएगी, अर्थात्:-

### अनुसूची - 3

[खण्ड 2 (जे) और (थ) देखें]

#### भाग - क

#### जैवउर्वरकों का विनिर्देश

##### 1. राइजोधियम

|       |  |   |  |
|-------|--|---|--|
| (i)   | आधार   | = | वाहक आधारित* अथवा तरल आधारित   |
| (ii)  | व्यवहार्य कोशिका संख्या                                      | = | सीएफयू वाहक सामग्री का न्यूनतम 10 कोशिका/प्रति ग्राम अथवा तरल पदार्थ का 10 कोशिका मि.ली. |
| (iii) | संदूषण स्तर  | = | 10 तनुकरण पर कोई संदूषण नहीं ।   |
| (iv)  | पीएच   | = | 6.5 - 7.5  |
| (v)   | वाहक आधारित सामग्री के मामले में कण आकार                     | = | सभी सामग्री 0.15 - 0.212 मिमी. भारतीय मानक छलनी में से निकल जाएगी ।                      |
| (vi)  | आर्द्रता प्रतिशत भार द्वारा, वाहक आधारित के मामले में अधिकतम | = | 30 - 40%   |
| (vii) | क्षमता पिशेषता   | = | पैकेट पर सूचीबद्ध सभी प्रजातियों पर प्रभावी नोड्युलेशन दिखना चाहिए ।                     |

##### वाहक की किस्म :

वाहक सामग्री जैसे पीट, लिग्नाईट, पीट मूदा, खाद-मिट्टी, काठकोयला अथवा समरूप सामग्री जो जीव के विकास में सहायक हो ।

## 2. एजोटोबैक्टर

|       |  |   |   |
|-------|--|---|---|
| (i)   | आधार                                     | = | वाहक आधारित*अथवा तरल आधारित   |
| (ii)  | व्यवहार्य कोशिका संख्या                  | = | सीएफयू वाहक सामग्री का न्यूनतम 10 कोशिका/प्रति ग्राम अथवा तरल पदार्थ का 10 कोशिका/मि.ली.                      |
| (iii) | संदूषण स्तर                              | = | 10 तनुकरण पर कोई संदूषण नहीं।   |
| (iv)  | पीएच                                     | = | 6.5 - 7.5   |
| (v)   | वाहक आधारित सामग्री के मामले में कण आकार | = | सभी सामग्री 0.15 - 0.212 मिमी. भारतीय मानक छलनी में से निकल जाएगी।  |
| (vi)  | आर्द्रता प्रतिशत भार द्वारा, अधिकतम      | = | 30 - 40%  |
| (vii) | क्षमता विशेषता                           | = | किस्म में उपभोग किए गए सूक्रोज के कम से कम 10 मिग्रा. नाइट्रोजन प्रति ग्राम के निर्धारण की क्षमता होनी चाहिए। |

\* वाहक की किस्म :

वाहक सामग्री जैसे पीट, लिग्नाईट, पीट मृदा, खाद-मिट्टी, काटकोयला अथवा समरूप सामग्री जो जीव के विकास में सहायक हो।

## 3. एजोसापिरिलम

|       |  |   |  |
|-------|--|---|--|
| (i)   | आधार   | = | वाहक आधारित*अथवा तरल आधारित  |
| (ii)  | व्यवहार्य कोशिका संख्या                                      | = | सीएफयू वाहक सामग्री का न्यूनतम 10 कोशिका/प्रति ग्राम अथवा तरल पदार्थ का 10 कोशिका/मि.ली. |
| (iii) | संदूषण स्तर  | = | 10 तनुकरण पर कोई संदूषण नहीं।  |
| (iv)  | पीएच   | = | 6.5 - 7.5  |
| (v)   | वाहक आधारित सामग्री के मामले में कण आकार                     | = | सभी सामग्री 0.15 - 0.212 मिमी. भारतीय मानक छलनी में से निकल जाएगी।                       |
| (vi)  | आर्द्रता प्रतिशत भार द्वारा, वाहक आधारित के मामले में अधिकतम | = | 30 - 40%   |
| (vii) | क्षमता विशेषता   | = | अर्धठोस नाइट्रोजन मुक्त ब्रोमोथाइमोल नीले माध्यम में सफेद लिली का बनना।                  |

\* वाहक की किस्म :

वाहक सामग्री जैसे पीट, लिग्नाईट, पीट मृदा, खाद-मिट्टी, काटकोयला अथवा समरूप सामग्री जो जीव के विकास में सहायक हो।

#### **4. पीएसवी**

|       |   |   |   |
|-------|---|---|---|
| (i)   | आधार  | = | वाहक आधारित*अथवा तरल आधारित   |
| (ii)  | व्यवहार्य कोशिका संख्या                                     | = | सीएफयू वाहक सामग्री का न्यूनतम 10 कोशिका/प्रति ग्राम अथवा तरल पदार्थ का 10 कोशिका/मि.ली. ।  |
| (iii) | संदूषण स्तर   | = | 10 तनुकरण पर कोई संदूषण नहीं ।  |
| (iv)  | पीएच  | = | 6.5 - 7.5   |
| (v)   | वाहक आधारित सामग्री के मामले में कण आकार                    | = | सभी सामग्री 0.15 - 0.212 मि.मी. भारतीय मानक छलनी में से निकल जाएगी ।  |
| (vi)  | आद्रिता प्रतिशत भार द्वारा, वाहक आधारित के मामले में अधिकतम | = | 30 - 40%  |
| (vii) | क्षमता विशेषता  | = | स्पैक्ट्रोफोटोमीट्रिक रूप से परीक्षण करने पर किस्म में कम से कम 30% की रेंज में फास्फेट की क्षमता होनी चाहिए । जोन बनने के हिसाब से निर्धारित भाव्यम में न्यूनतम 5 मि.मी. घुलनशील जोन जिसमें कम से कम 3 मि.मी. मोटाई हो । |

#### \* वाहक की किस्म :

वाहक सामग्री जैसे पीट, लिग्नाइट, पीट मृदा, खाद-मिट्टी, काठकोयला अथवा समरूप सामग्री जो जीव के विकास में सहायक हो ।

#### भाग - ख

#### जैव उर्वरक की सहन सीमा

वाहक का  $5 \times 10$  सीएफयू/प्रति ग्राम अथवा तरल पदार्थ का प्रति मि.ली.

#### भाग - ग

#### जैव उर्वरक के नमूने लेने की प्रक्रिया

#### जैव उर्वरकों की सैम्पर्लिंग की प्रक्रिया

#### **1. सामान्य अपेक्षाएँ**

1.0 नमूनों को लेने, तैयार करने और रखरखाव में निम्नलिखित सावधानियों और निर्देशों का पालन किया जाना चाहिए ।

1.1 नमूना लेने का कार्य प्रशिक्षित और अनुभवी व्यक्ति द्वारा किया जाय इसलिए यह आवश्यक है कि नमूना जाँच किए जाने वाले छेर का प्रतिनिधि हो ।

1.2 घूँकि नमूने सूक्ष्म जैविक विश्लेषण के लिए भी लिए जाते हैं, इसलिए नमूना लेते समय अति संदूषण की रोकने के लिए अत्यधिक सावधानी की जरूरत है और प्रयोगशाला में जाँच के लिए तैयार होने तक उन्हें उनकी वास्तविक स्थिति में संरक्षित रखा जाय ।

1.2.1 सूक्ष्म जैविक विश्लेषण के लिए रखे गए नमूनों के साथ कोई परिरक्षक पदार्थ अथवा जीवाणु/फूटूदी एजेन्ट न शामिल किए जाएंगे ।

1.3 नमूनों को उनकी वास्तविक स्थिति में बंद पैकेटों से लिए जाय और उन्हें प्रयोगशाला में भेजा जाय । जिससे रखरखाव के दौरान नमूनों के सम्भावित संदूषण से बचा जा सकेगा और सामग्री की शुद्ध स्थिति को स्पष्ट करने में सहायता मिलेगी ।

1.4 स्वच्छ पैकेटों को संरक्षित स्थान से लिया जाय जो नमी, हवा, प्रकाश धूल अथवा कालिख में खुला न हो और इसे स्वच्छ कन्टेनरों में हस्तातरित किया जाय ।

2. नमूना लेने के लिए उपकरण

2.1 स्टैनलेस स्टील का बना हुआ एक उचित स्कूप का प्रयोग नमूनों को लेने के लिए किया जा सकता है।

2.2 नमूना लेने सम्बन्धी उपकरण पूर्णतया: स्वच्छ और विसंक्रमित हो । इसे उचित रूप से कम से कम दो घंटे तक 160 से पर गर्म एयर ओवेन में गर्म करके अथवा 120 से पर कम से कम 20 मिनट तक आटो-क्लेविंग द्वारा विसंक्रमित किया जाय और इसे उचित कन्टेनर में रखा जाय ताकि पुनः संदूषण से बचा जा सके ।

3. नमूनों का पैमाना

3.1 छेर

सभी इकाइयाँ (किसी एक प्रकार की सामग्री की एक खेप जो विनिर्माण के एक ही बैच से सम्बन्धित हो के कन्टेनर्स) एक छेर से सम्बन्धित होंगी । यदि किसी खेप में विनिर्माण के भिन्न-भिन्न बैच हों तो एक बैच वाले कन्टेनरों को अलग किया जाय और उनका अलग छेर बनाया जाए ।

3.2 बैच

किसी बैच फरमेटर या फ्लास्कों के समूह से तैयार किया गया कोई संरोपण (इनोकुलेन्ट) एक बैच गढ़ित करेगा ।

3.3 विनिर्देश की अपेक्षाओं के लिए सामग्री की सुनिश्चितता निर्धारित करने के लिए नमूनों का प्रत्येक छेर से अलग-अलग रूप से जाँच की जाएगी ।

3.4 एक छेर से चयन किए गए पैकेटों की संख्या छेर के आकार पर निर्भर करेगी और इन पैकेटों का चयन यादृच्छिक रूप से और चयन की यादृच्छिकता को सुनिश्चित करते हुए, किया जाएगा ।

4. नमूनों का लिया जाना :

4.1 इस नमूनों को प्रत्येक छेर से पृथक रूप से लिया जाना चाहिए ।

भाग - घजैवउर्वरक के विश्लेषण की रीति

## 1.क. राइजोवियम जैव-उर्वरकों के विश्लेषण की रीति

## 1. औषार

- 1.1 क्रांयक पिपेट 1 मि. ली. और 10 मि.ली.
- 1.2 डिलूसन बोटल्स या फ्लास्क
- 1.3 पेट्री डिसेज स्वच्छ, यूनिफार्म, घपटीतली वाला
- 1.4 गर्भ - एयर ओवेन

जो एकसमान और पर्याप्त तापमान देने में सक्षम हो, जिसमें थर्मामीटर लगा हो जो 250 सी तक मापने में समर्थ हो और उचित रूप से सुराग हो ताकि सटीक एवं समान गर्भों को सुनिश्चित किया जा सके।

## 1.5 ऑटोक्लेव

## 1.6 इनक्यूबेटर

## 1.7 हेड टेली या मैकेनिकल काउंटिंग डिवाइस

## 1.8 पीएच मीटर

## 2. प्रतिकर्मक

## 2.1 कांगो लाल-एक प्रतिशत जलीय धोल

## 2.2 मध्यम

निम्नलिखित मिश्रण के प्लेटिंग माध्यम का प्रयोग

अगर

20 ग्रा

यीस्ट एक्स्ट्रैट

1 ग्रा

मान्निटोल

10 ग्रा

पोटाशियम हाइड्रोजन फास्फेट (के एचपीओ )

0.5 ग्रा

मैग्नेशियम सल्फेट (एमजीएसओ 7 एच ओ)

0.2 ग्रा

सोडियम क्लोराइड (एनएसीएल)

0.1 ग्रा

कांगो लाल

2.5 मि.ली.

विसंक्रमित जल

1000 मि.ली.

पीएच

7.0

## 2.3 प्लेटों के लिए विसंक्रमण एवं तैयारी की प्रक्रिया

2.3.1 कम से कम 160 सी पर 2 घंटे तक एक गर्म एयर ओवन में शुष्क गर्मी में सैम्प्लिंग और प्लेटिंग उपकरण को विसंक्रमित करें।

2.3.2 20 मिनट तक 120 सी पर आटोक्लेबिंग द्वारा मीडियम को विसंक्रमित करें। आटोक्लेब के दौरान बन्द कन्टेनर से भाष्यक के सार्व को बनाए, क्रांग को ढीला रखें या रूई से बन्द रखें। स्टेलाइजर चैम्बर की हवा को छोड़ जिससे भाप का दबाव बढ़े।

### प्लेटिंग मीडियम की तैयारी करना और उसको प्रवाहित करना

2.3.3 विशिष्ट जैव उर्वरक के मिश्रण के अनुसार विकास मीडियम को तैयार करें।

2.3.4 उबलते पानी में मीडियम की अपेक्षित मात्रा को पिघलाए या आंशिक रूप से बन्द कन्टेनर में प्रवाहित भाप में खोल कर पिघलाए लेकिन पिघलने के दौरान या बाद में अनावश्यक उच्च तापमान में लम्बे समय तक खोलने से बचें। मीडियम को पर्याप्त पिघलाए जिसका प्रयोग 3 घंटे में किया जायेगा। मीडियम के पुनः विसंक्रमण से संघटकों के आंशिक अवक्षेपण की स्थिति आ सकती है।

2.3.5 जब रखने का समय 30 मिनट से कम हो तब पिघले मीडियम को लगभग 45 सी पर ठीक से ढंडा होने दे और प्रयोग में लाने तक 43 से 45 सी पर वाटर वाथ या इनकुवेटर में स्टोर करें। प्रत्येक प्लेट में 42 से 44 सी पर 12 से 15 मि.ली. तरलीकृत मीडियम या पैट्रीडिस के आकार के आधार पर उचित मात्रा को मिलाएं। डिस्क के कवर को हल्के हाथ से उतना ही उठाए जितना मीडियम में डाला जा सके, ली में मीडियम कन्टेनरों के ढक्कन को खोलकर इसे विसंक्रमित करें।

(क) डालने के तुरन्त पहले

(ख) डालते समय रुक-रुक कर, और

(ग) जब प्लेटों के प्रत्येक बैच के लिए डालने का कार्य पूरा हो जाए, यदि कन्टेनरों में पिघले मीडियम के अंश शेष रहते हो और अतिरिक्त प्लेटों को डालने के लिए अनुपर्ती विसंक्रमण के बिना प्रयोग किया जाना होता है। क्योंकि पैट्रीडिस में परीक्षण वाले अंशों के साथ सघनता से मीडियम को मिलाने के लिए प्रत्येक प्लेट डाला जाता है।

2.3.6 डिस को घुमाते हुए और फैलाते हुए जिससे किनारे तक मीडियम का छिड़काव न हो पावें, मीडियम की प्लेट की तली पर फैलाएं। ऐसी स्थिति बनाए जिससे सतह के स्तर से प्लेटों को हटाने से पहले मीडियम तर्क संगत ढंग से (5-10 मिनट) ठोस हो सके।

### 3. प्लेट काउन्ट्स के लिए श्रेणीबद्ध घोलों की तैयारी :

3.1 270 मि.ली. विसंक्रमित जल में 30 ग्राम इनोकुलेन्ट मिलाएं और रिसीप्रोकल शेकर या होमोजेनीसर पर 10 मिनट तक हिलाएं। 10 तक श्रेणीबद्ध घोलों को तैयार करें। विसंक्रमित पिपटीस का प्रयोग करते हुए 0.1 मि.ली. या 10 से 10 घोलों के उचित एलीकोट्स को लें और सेट मीडियम वाले पैट्रीडिजेट में डालें जैसा कि 2.1 में दिया गया है और स्प्रेडर के साथ समान रूप से इसे फैलाएं। प्लेटों को बदलें और उन्हें इनकुवेटर में ठीक से रखें।

#### 4. प्लेटों को परिपाक करना

4.1 प्लेटों पर पर्ची लगाओ और तेजी से विकसित होने वाले रिजोबिया को 3 से 5 दिनों तक तथा धीरे विकसित होने वाले रिजोबियां को 5 से 10 दिनों तक के लिए 28+/-2 डिग्री सेंटीग्रेड पर परिपाक करें।

#### 4.2 काउंटिंग एडस कोलोनी

एकरूप और यथोचित नियंत्रित कृत्रिम प्रदीपन के तहत आवर्धक लैन्स की सहायता से कोलोनियों को गिने। एक कोलोनी (गणित्र) काउंटर का प्रयोग करे जो मार्गदर्शन प्लेट और वर्ग सैटीमीटर में खींची हुई रेखा से संज्ञित हो। हेंड टैली के साथ कोलोनियों की कुल संख्या का रिकार्ड रखें। पिन-प्याइट कोलोनियों के लिए प्लेटों में मीडियम अविलीन अथवा अक्सेप्टि सामग्री के लबलेश में गलती करने से बचें। कोलोनियों का धूल, कणिकाओं और अन्य आहरी वस्तु से अन्तर करें तथा संदेहास्पद वस्तुओं की साधानीपूर्वक जांच करें।

4.3 सभी प्लेटों पर विचार करे कि न्तु परिकलन के उद्देश्य से प्रति प्लेट 300 कोलोनियों से कम तथा 30 से अधिक दर्शाने वाली प्लेटों पर विचार करें। यह उन कोलोनियों के संबंध में नहीं है जो कांगों रैड को सोख लेती है और रेडिश कोलोनी के रूप में स्पष्ट दिखाई देती है। रिजोबियम सफेद, पारभासक, घमकदार और उन्नयित कोलोनियों के रूप में स्पष्ट दिखाई देता है। ऐसे कोलोनी संख्या गिनें और वाहक की प्रति लीटर के अनुसार आंकड़ों को गिने। 10 अवमिश्रण पर संदूषण से मुक्ति की भी जांच करें।

### 5. ग्रन्थिका का परीक्षण

#### 5.1 पॉट कल्चर ट्रस्ट

पौधा पोषक तत्व विलेयन

|     | संघटन                                 | सान्द्रता | ग्रा./ली. |
|-----|---------------------------------------|-----------|-----------|
| (क) | पोटाशियम क्लोराइड                     | 0.001 मि. | 0.0745    |
| (ख) | पोटाशियम हाइड्रोजन फासफेट (के एचपीओ ) | 0.001 मि. | 0.175     |
| (ग) | कैल्शियम सल्फेट (सीएएसओ एच ओ)         | 0.002 मि. | 0.344     |
| (घ) | मैरनीशियम सल्फेट (एमजीएसओ एच ओ)       | 0.001 मि. | 0.246     |

## (उ) सूक्ष्ममात्रिक तत्व विलेयन :

|     |  |                          |      |
|-----|--|--------------------------|------|
| (1) | कापर सल्फेट (सीयूएसओ <sub>4</sub> 5एच <sub>2</sub> ओ)  | 0.01 मि.ग्रा./कि.ग्रा.   | 0.78 |
| (2) | जिंक सल्फेट (जेडएनएसओ <sub>4</sub> 7एच <sub>2</sub> ओ)   | 0.25 मि.ग्रा./कि.ग्रा.   | 2.22 |
| (3) | मैग्नीज सल्फेट (एमएनएसओ <sub>4</sub> 4एच <sub>2</sub> ओ)   | 0.25 मि.ग्रा./कि.ग्रा.   | 2.03 |
| (4) | अमोनिया मालीबडेट [(एनएस <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> एमओ <sub>7</sub> ओ <sub>2</sub> एच <sub>2</sub> ओ] | 0.0025 मि.ग्रा./कि.ग्रा. | 0.01 |
| (5) | बोरिक एसिड (एच <sub>3</sub> बीओ <sub>4</sub> )   | 0.125 मि.ग्रा./कि.ग्रा.  | 1.43 |

विलेयन संख्या (उ) को तैयार करे जिसमें स्टाक घोल के एक लीटर में सूक्ष्ममात्रिक तत्व हों और प्रति लीटर में 0.5 मि.ली. की दर से तैयार पोषक तत्व विलयन डालें ।

ग्रा/100 मि.ली.

|     |              |   |
|-----|--------------|---|
| (1) | फेरस सल्फेट  | 5 |
| (2) | सिट्रिक एसिड | 5 |

घोल संख्या (घ) को स्टाक घोल के 100 मि.ली. रूप में तैयार करें प्रति लीटर 0.5 मि.ली. की दर से तैयार पोषक तत्व घोल में डालें ।

## तैयारी

(क) (ख) और (घ) पदार्थों को तौलते हुए पोषक तत्व घोल तैयार करना और उन्हें एक लीटर पानी में घोलना । इस घोल में 0.5 मि.ली. सूक्ष्ममात्रिक तत्व घोल और 0.5 मि.ली. लौह घोल डालें । अच्छा सम्मिश्रण बनाने के लिए कैल्शियम सल्फेट (ग) का 0.344 ग्राम मोरटार में पीसें और तैयार पोषक तत्व घोल में डालें । पोषक तत्व घोल को भाप सहमात्र में डालें इस प्रकार 20 मिनट के लिए 120 डिग्री सैंटीग्रेड पर तैयार करें ।

## टिप्पणियां

- पोषक तत्व घोल को नल के पानी में तैयार किया जाए बशर्ते कि जल शुद्ध हो ।
- तैयार करने से पूर्व कैल्शियम सल्फेट को फैलाने के लिए पोषक तत्व घोल को अच्छी तरह हिलाया जाना चाहिए ।
- यदि सोल्यूशन आसवित जल से बनाया जाता है तो भाप सहमात्र से पूर्व पी एच लगभग 7.2 है और भाप सहमात्र पर 5.5 तक गिर जाता है और लगभग 5.8 तक की स्थिति पर धीरे-धीरे बढ़ता है । तथापि पी एच का समायोजन करने की कोई आवश्यकता नहीं है । अधिकांश उष्णकटिबंधीय शिम्बों में लगभग 6.0 पी एच पर्याप्त है ।

### 5.3 प्रक्रिया

5.3.1 95 प्रतिशत एल्कोहल में बीज डालें और तत्पश्चात् नदीन रूप से तैयार कलोरीन जल से सतह को जीवाणुनाशन करें (15 से 20 मिनट के लिए) अथवा उचित उब्बें में जैसे पेचदार ढक्कन वाली बोतल में अथवा लटके हुए रबड़ के साथ टैस्ट-ट्यूब में 3 मिनट तक 0.1 प्रतिशत मरक्यूरिक क्लोराइट घोल में डालें। मोटे छिलके वाले बीजों के मामले में सान्द्रित सल्फ्यूरिक एसिड को 20 से 30 मिनट तक के लिए जीवाणुहीन सतह के रूप में प्रयोग किया जाए। यह सिफारिश की जाती है कि बीजों को सल्फ्यूरिक एसिड के साथ सतह को जीवाणुहीन करने के पूर्व कैल्शियम क्लोराइड वाले डैसीकेटर में पूरी रात रखा जाना चाहिए। स्टैरीलैंटस से छुटकारा पाने के लिए जीवाणुहीन डालें और जीवाणुहीन जल में कई बार बीजों को धोएं (कम से कम 10 बार)। मिट्टी के अथवा कांच के बर्तनों को मिट्टी से भरे (दो भाग मिट्टी और एक भाग धुली हुई मोटी रेत) (पी. एच 6 से 7) और 120 डिग्री सैंटीग्रेड पर 2 घंटे के लिए ओटोक्लेयर करें। दो दिन के पश्चात् कक्ष के तापमान पर इन्क्यूबेशन करें, मिट्टी का पूर्ण उपजाऊपन सुनिश्चित करने के लिए आटोक्लेयिंग दोहराएं। कल्वर पैकेट (15 से 10ग्रा., बीज के आकार पर निर्भर इनोकुलेट का प्रति ग्राम) से लिए गए इनोकुलेट के जल के घोल के साथ सतह-जीवाणुहीन बीजों को इनोकुलेट करें और बीजों को बोएं। एक सैट पात्रों को रखें जिसमें नियन्त्रण के रूप में अनइनोकुलेटेड बीज में और एक सैट पात्रों का ऐसा रखें जिसमें नियन्त्रण सहायक के रूप में 100 कि.ग्रा. एन एचए की दर से अमोनिया नाइट्रेट डालें। नियन्त्रण पाटों से इनोकुलेटिड पोटों को पृथक करने पर ध्यान रखते हुए यथोचित पौधों के लिए यथोचित भौसमों के दौरान पोट-कल्वर हाउस में उन्हें इन्क्यूबेट करें। यदि विकास कक्षों अथवा कैबिनेटों में तापमान को अनुकूल बनाने वाली सुविधाएं हैं और प्रकाश भी उपलब्ध है तो पात्रों को ऐसी नियन्त्रित पर्यावरणीय स्थितियों में इन्क्यूबेटिड किया जाए। पोषक तत्व सोल्यूशन को 20 मिनट के लिए 120 डिग्री सैंटीग्रेड पर जीवाणुरहित किया जाए और प्रत्येक पात्र की एक बार सिराई की जाए जिससे कि मृदा की नभी धारक क्षमता बनी रहे। तत्पश्चात् जीवाणुरहित जल से वरीय रूप से प्लाटिक ट्यूब के माध्यम से आदायिक रूप से अंकुरणों पर जल डालें इस पर ध्यान रखा जाए कि इनोकुलेटिड पात्रों से अनइनोकुलेटिड पात्रों में जल उछल कर न जाए। साखियकीय विश्लेषण के लिए प्रत्येक वानस्पतिक प्रजातियों के लिए दोहरे पात्रों (4 से 6 तक) की अपेक्षित संख्या बनाई रखी जाए।

5.3.2 विकास के दो से तीन सप्ताहों के पश्चात् प्रत्येक पात्र में पौधों की संख्या को चार एकरूप पौधों तक कम करते जाएं। 6 से 8 सप्ताहों के अंत तक पाटों के सैट को नियन्त्रण और इनोकुलेटिड शृंखला से उठाएं और धीमी गति से चलने वाले जल के अंतर्गत मृदा से ध्यानपूर्वक पौधों को पृथक करें। नोड्यूलस की संख्या, रंग (प्रभावी नाड्यूल्स गुलाबी अथवा लाल हैं) और मात्रा संबंधी आंकड़े प्राप्त करे। 6 से 8 सप्ताहों के अंत में शूट सिस्टम की कटाई करें, 48 घंटों के लिए 60 डिग्री सैंटीग्रेड पर सुखाएं और शुष्क मात्रा निर्धारित करें। उपर्युक्त उद्देश्य से पात्रों का दोहरापन (4 से 16 तक) पर्याप्त रूप से बनाए रखें।

5.3.3 जब नोड्यूल्स को रेजर ब्लेड से काट कर खोला जाता है तो दिखाई देने पर नोड्यूल्स के गुलाबी रंग के गठन के संबंध में नोड्यूलेशन आंकड़ों को अभिलिखित किया जाए। पौधों की शुष्क मात्रा और नोड्यूलेशन आंकड़ों के आधार पर आंकड़ों की संगणना करने के पश्चात् कल्वर की प्रभाविता निर्धारित होती है। यदि रस्थानीय अभाव में अथवा कभी-कभी छुटपुट नोड्यूल्सों की विद्यमानता नियंत्रण में होती है तो उसके साथ इनोकुलेशन पौधों में अच्छा प्रभावी गुलाबी मोड्यूलेशन प्राप्त हो जाता है और यदि नाइट्रेट के बिना अनोनोकुमटिड नियंत्रण के समाप्त होने पर पौधों की शुष्क मात्रा में 50 प्रतिशत तक बढ़ोतरी होती है, तो यह निष्कर्ष निकाला जा सकता है कि कल्वर अपेक्षित गुणवत्ता का है।

#### 1.ख. आपोटोबैक्टर जैव उर्वरक के विश्लेषण की रीति

1. एपरेटस - वही जैसी कि रिजोवियम की है।

2. अभिकर्मक
3. माध्यम

निम्नलिखित संघटन का प्लोटिंग माध्यम प्रयोग करें।

|   |             |
|---|-------------|
| अगर   | 20 ग्रा.    |
| सूक्ष्मज (सी <sub>12</sub> एच <sub>22</sub> ओ <sub>11</sub> )               | 20.0 ग्रा.  |
| फैरिक सल्फेट (एफई <sub>2</sub> (एसओ <sub>4</sub> )                          | 0.1 ग्रा.   |
| डाइबेसिक पोटाशियम फासफेट (के <sub>2</sub> एचपीओ <sub>4</sub> )              | 1.0 ग्रा.   |
| मैग्नीशियम सल्फेट (एमजीएसओ <sub>4</sub> प्रैच <sub>2</sub> ओ <sub>4</sub> ) | 0.5 ग्रा.   |
| सोडियम क्लोराइड (एनएसीएल)   | 0.5 ग्रा.   |
| कैल्शियम कार्बोनेट (सीएसीओ )  | 2.0 ग्रा.   |
| सोडियम मोलीबडेट (एनए <sub>2</sub> एम्ब्री ओ <sub>4</sub> )                  | 0.005 ग्रा. |
| आसवित जल  | 1000 मि.ली. |
| पी एच   | 6.8 से 7.2  |

2.2 प्लेटों की तैयारी प्रक्रिया और जीवाणुहीन बनाना :-

उसी प्रकार जैसी कि रिजोवियम के लिए है।

प्लोटिंग माध्यम को तैयार करना और पोरिंग

3. प्लेट काउंटों के लिए क्रमिक अवमिश्रण को तैयार करना :

30 ग्राम इनोकुलेट से 270 मि.ली. जीवाणुहीन आसवित जल डाले और शेकर में परस्पर 10

मिनट तक हिलाएं। 10 तक क्रमिक अवमिश्रण बनाए अथवा जीवाणुहीन नलिकाओं का प्रयोग करते हुए 10 से 10 अवमिश्रणों का उचित एलकोटस 0.1 मि.ली. लें और व्यवस्थित माध्यम वाली पैटरी डिशों में डालें और एकसार फैलाएं। प्लेटों को औंधा करें और तत्काल उन्हें इनक्यूबेटर में रखें।

#### 4. प्लेटों का इनक्यूबेशन : उसी प्रकार जैसे कि रिजोबियम में है।

4.1 प्लेटों पर पर्ची लगाएं और 4 से 6 दिनों तक के लिए 28+/-3 डिग्री सैंटीग्रेड पर इनक्यूबेट करें।

4.2 कोलोनी कांउटिंग एडस : उसी प्रकार जैसे कि रिजोबियम में है।

एजेटोबैक्टर करोकोकम कोलोनियां चिपचिपी होती हैं, रेखाओं के साथ या उसके बिना बढ़ती हैं तो चिपचिपी और प्रायः चिपकने वाली होती है। रंजकता अत्यधिक हल्के भूरे से काले रंग तक अलग-अलग होती है। कोलोनी संख्या गिने और सिट गठन का अवलोकन करें जैसाकि नीचे दिया गया है और वाहक सामग्री की प्रति ग्राम संख्या की गिनती करें।

वानस्पति कोशिकाओं को 30 डिग्री सैंटीग्रेड पर अगर मीडियम पर विकसित करे जिससे सूक्ष्मेज 20 ग्रा., डाईपोटाशियम हाइड्रोजन फासफेट 0.64 ग्रा., डाईहाइड्रोजन पोटेशियम फासफेट 0.20 ग्रा., सोडियम क्लोराइड 0.20 ग्रा., कैल्शियम सल्फेट 0.05 ग्रा., सोडियम मोलिबडेट 0.001 ग्रा., फेरिक सल्फेट 0.003 ग्रा., अगर 20 ग्रा. और आवश्यक जल 1.000 मि.ली. सश्रिहित हो। वानस्पतिक कोशिकाओं का 18 से 24 घंटों के पश्चात् या तो साधारण अभिरंजक रीति से अथवा विषम स्थिति वाले खुर्दबीन के माध्यम से अवलोकन करें।

बर्वर्स अगर मीडियम पर सिस्ट कोशिकाओं को विकसित करें जैसा कि कार्यन स्रोत के स्थान पर उपर्युक्त में 0.3 प्रतिशत एन-बूटानोल के साथ दिया गया है। सिस्ट गठन के लिए 4 से 5 दिनों के पश्चात् क्यूबेशन में अवलोकन करें।

#### 5. प्योर कल्वर में नाइट्रोजन निर्धारण के लिए परीक्षण

##### 5.1 प्योर कल्वर मीडियम

5.1.1. मीडियम को ऐसा तैयार करें जैसा कि अगर को छोड़कर एजेटोबैक्टर (1बी के अंतर्गत 2.1) के लिए दिया गया है।

## 5.2 प्रक्रिया

प्रत्येक एजोटोबैक्टर कोलोनी के उस प्रकार में से चुनें, जिसे एजोटोबैक्टर क्रोकोकम के रूप में गिना गया है। मीडियम पर एक कोलोनी और प्लेट अन्दर दी गई है। नाइट्रोजन निर्धारण के लिए ब्रोथ-इनोकुलेटिंग के लिए इस प्योर कल्चर का प्रयोग करें। इस हेतु इनोकुलेशन के लिए 250 मि.ली. कोमीकिल फ्लास्क में ब्रॉथ के 50 मि.ली. एलीकोट्स लें। 12 दिनों के पश्चात् 28 डिग्री सं. ग्रेड पर विकसित करें, शुद्धता के लिए नवीन मीडियम पर रेखाओं से चिन्हित करते हुए फ्लास्क की सामग्री का परीक्षण और जल में घुलने की क्रिया (50 से 60 डिग्री सैंटीग्रेड) से शुष्क होने तक सान्द्रित करना। सूखे हुए कल्चर को धो ले और नमूने के रूप में इसे लें। इनोकुलेटिड नियंत्रण शृंखलाओं में फ्लास्क की विषयवस्तु को उसी रीति से संसाधित किया जाना चाहिए।

## 5.3 जेल डाहल विधि द्वारा निर्धारण

- (i) अभिकर्मक
- (ii) सल्फ्यूरिक एसिड - 93-98 प्रतिशत, एन-मुक्त
- (iii) उपचारण मिश्रण - कॉपर सल्फेट और पोटेशियम सल्फेट को 1:10 के अनुपात में मिलाएं तथा महीन चूर्ण बनाए।
- (iv) सोडियम हाइड्रॉक्साइड की गोलियां अथवा विलेयन, नाइट्रोजन मुक्त - विलेयन के लिए जल में लगभग 450 ग्राम सोडियम हाइड्रॉक्साइड धोलें, उसे ठंडा करें तथा एक लीटर तक तनुकृत करें (विलयन का विशिष्ट गुरुत्व कम से कम 1.36 होना चाहिए)।
- v) जिन्क के महीन दाने - अभिकर्मक ग्रेड।
- vi) संकेतक :-  
 (क) मिथाईल लाल संकेद्वारा - 1 ग्राम मिथाईल लाल को 200 मिलीलीटर ईथानोल में धोलें।
- (ख) मिश्रित संकेद्वारा - 500 मिलीलीटर ईथानोल में 0.8 मिथाईल लाल और 0.2 ग्राम मिथाईल नीला को धोलकर मिश्रित संकेतक तैयार करें।
- vii) हाइड्रोक्लोरिक अथवा सल्फ्यूरिक अम्ल - जब नाइट्रोजन की मात्रा कम हो तो मानक विलेयन 0.5 अथवा 0.1 एन०।
- viii) सोडियम हाइड्रोकार्बनेट मानक विलेयन - 0.1 नाइट्रोजन (अथवा अन्य विशिष्ट सांदरण)।

**नोट:-** उचित तापमान नियंत्रण हेतु उपचारण के अंत में लवण और अम्ल का अनुपात 1.1 होना चाहिए। निम्न अनुपात पर उपचारण अपूर्ण हो सकता है और उच्च अनुपात पर नाइट्रोजन में कमी आ सकती है। उपचारण के दौरान एक ग्राम वसा 10 मिलीलीटर सल्फ्यूरिक अम्ल की खपत करता है और एक ग्राम कार्बोहाइड्रेट 4.0 मिलीलीटर सल्फ्यूरिक अम्ल की खपत करता है।

#### 5.4 साधित्र

- उपचारण के लिए - लगभग 500 से 800 मिलीलीटर की कुल क्षमता की कठोर, मध्यम मोटाई, सुतापानुशीति काँच का जेलडाहल फ्लास्क का इस्तेमाल करें तथा तापन यंत्र में उपचारण करें जिसे लगभग 5 मिनट में चक्रिय क्वथन के लिए 25 डिग्री सेंटीग्रेड पर 250 मिलीलीटर जल को लाने के लिए समायोजित किया गया। हीटरों के परीक्षण के लिए गैस बर्नर के मामले में 10 मिनट तक पूर्वतापन करें तथा विद्युत हीटरों के मामले में 30 मिनट तक तापन करें। अत्यधिक तापन से बचने के लिए 3-4 क्वथन चिप डालें।
- आसवन के लिए - रबड़ स्टॉपर, जिसमें से आसवन के दौरान सोडियम हाइड्रोक्साइड के यांत्रिक कैरी-ऑवर को रोकने के लिए कुशल स्क्रबर बल्ब अथवा ट्रैप का निचला सिरा गुजरता है, से युक्त 500 से 800 मिलीलीटर जेलडाहल फ्लास्क का प्रयोग करें। बल्ब ट्यूब के ऊपरी सिरे को रबड़ ट्यूब द्वारा कंडेन्सर से जोड़ें। संघनित्र के निकास को इस ढंग से ट्रैप करें कि प्रापक के साथ आसुत अमोनिया का अवशोषण सुनिश्चित हो जाए।
- प्रक्रिया :-  
उपचारण फ्लास्क में 0.25 ग्राम नमूना रखें। 0.7 ग्राम मरक्यूरिक ऑक्साइड, 15 ग्राम पोटोशियम सल्फेट और 25 मिलीलीटर सल्फ्यूरिक अम्ल मिलाएं। इसे हिलाएं, लगभग 30 मिनट तक स्थिर रखें और झाग के थमने तक इसे सावधानीपूर्वक गर्म करें। तेजी से गर्म करें जब तक कि विलेयन साफ न हो जाए और इसे अगले 90 मिनट तक उबालना जारी रखें। इसे ठंडा करें, लगभग 200 मिलीलीटर जल मिलाएं, कमरे के तापमान पर इसे ठंडा करें और कुछ जिन्क के महीन दाने मिलाएं।
- फ्लास्क को झुकाएं तथा बिना प्रक्षोभ किए सावधानीपूर्वक 50 मिलीलीटर सोडियम हाइड्रोक्साइड विलेयन डालें। तत्काल उस संघनित्र से आसवन बल्ब को फ्लास्क से जोड़ें जिसका टिप प्रापक फ्लास्कों में मानक 0.1 एन अम्ल के 50 मिलीलीटर में झूबा हुआ हो। घटकों को मिलाने के लिए उपचारण फ्लास्क को घुमाएं। तब तक गर्म करें जब तक 150 मिलीलीटर आसवित पदार्थ इकट्ठा न हो जाए तथा मिथाईल लाल अथवा मिश्रित संकेतक का प्रयोग करते हुए 0.1 एन क्षार के साथ अत्यधिक अम्ल को अनुमापित करें। पुनः अभिकर्मकों पर ब्लैंक डिटरमिनेशन करें।

**नोट:-** अकार्बनिक नाइट्रोजन नियंत्रक, उदाहरणार्थ अमोनियम सल्फेट का उपयोग करते हुए आवधिक रूप से अमोनिया रिकॉर्डिंग की जांच करें।

ग) परिकलन:-

- (i) नाइट्रोजन घटक, मात्रा का प्रतिशत =  $(\text{नमूना के लिए } 0.1 \text{ एन अम्ल मिलीलीटर} - \text{ब्लैक के लिए } 0.1 \text{ एन अम्ल मिलीलीटर}) \times 0.14$   
लिए गए नमूने की मात्रा
- (ii) संवर्धन में कुल नाइट्रोजन = नमूने की कुल शुष्क मात्रा  $\times$  प्रतिशत नाइट्रोजन।
- (घ) निर्वातित श्रेणियों और नियंत्रकों, प्रत्येक से शुद्धता से तोले हुए 1.0 ग्राम नमूना लें। 250 मिलीलीटर आयसन के फ्लास्क में अलग-अलग रखें। 150 मिलीलीटर जल मिलाएं, घटकों को अच्छी तरह मिलाएं तथा 250 मिलीलीटर जल तैयार करें। 5 मिनट तक हिलाएं और 10,000 परिक्रमण/मिनट पर 15 मिनट तक अपकेन्द्रित करें। तीन प्रतियों में प्लावी में ग्लूकोज का आकलन करें। दोनों के बीच अंतर खपत किए गए ग्लूकोज की वास्तविक मात्रा प्रदान करती है। खपत किए गए सुकरोज की प्रति ग्राम निर्धारित नाइट्रोजन की मात्रा का पारेकलन करें।

**5.5 ग्लूकोज का अभिनिधारण:-** प्लावी से उपयुक्त एलिकॉट ले और निम्नलिखित विधि से उपचायक शब्दकर का आकलन करें :

- (i) अभिर्मक
- (ii) फेहलिंग विलेयन का सॉकरह्लेट आशोधन :- उपयोग के तत्काल पहले विलेयन क और विलेयन ख की सामान मात्रा का विलेयन तैयार करें।
- (iii) कॉपर सल्फेट विलेयन (विलेयन क) - जल में 34.639 ग्राम कॉपर सल्फेट क्रिस्टल (सीयूएसओ 4.5 एच2ओ) धोलें, 500 मिलीलीटर तक तनुकृत करें, और ग्लास वूल अथवा फिल्टर पेपर से छाने।

**कॉपर सल्फेट विलेयन का मानकीकरण:-** अलग-अलग पिपेटों का प्रयोग करते हुए, 250 मिलीलीटर क्षमता के शंकुदार फ्लास्क में विलेयन क का 5 मिलीलीटर और विलेयन ख का 5 मिलीलीटर शुद्धतापूर्वक मापें। एसबेस्टस गेज पर उबलने तक मिश्रण को गर्म करें और संभावित आयतन से लगभग 1 मिलीमीटर कम ब्यूरेट से मानक इनवर्ट शब्दकर विलेयन मिलाएं, जो पूर्ण रूप से फेहलिंग विलेयन का अपचयन करेगा (लगभग 48 मिलीलीटर)। विलेयन को उबलते रहने के लिए 1 मिलीलीटर मिथिलीन नीला संकेतक मिलाएं। तीन

मिनट के अंदर अनुमापन पूरा करें। नीले से लाल तक रंग परिवर्तन द्वारा अंतिम सिरे का संकेत मिलता है। प्रयोग किए गए इनवर्ट शक्कर विलेयन के आयतन से 0.001 द्वारा टाइटर मान को गुणा करके कॉपर सल्फेट विलेयन के स्ट्रेन्थ का परिकलन करें। यह 5 मिलीलीटर कॉपर सल्फेट विलेयन में कॉपर के अपचयन हेतु अपेक्षित इनवर्ट शक्कर की मात्रा देगा।

- (iv) पोटेशिम सोडियम टाइट्रेट (रोशेल लवण) विलेयन (विलेयन ख):- 173 ग्राम पोटेशियम सोडियम टाइट्रेट और 50 ग्राम सोडियम हाइड्रॉक्साईड जल में घोलें और 500 मिलीलीटर तक तनुकृत करें। एक दिन द्वारा विलेयन को छोड़ दें और इसके बाद छाने।
- (v) हाइड्रोक्लोरिक अम्ल - विशिष्ट गुरुत्व - 20 डिग्री सेंटीग्रेड पर 1.18 (लगभग 12 एन)
- (vi) मानक इनवर्ट शक्कर विलेयन - शुद्धतापूर्वक 0.95 ग्राम सुक्रोज तोले तथा इसे 500 मिलीलीटर जल में घोलें। 32 मिलीलीटर सांद्रित हाइड्रोक्लोरिक अम्ल मिलाएं, धीरे-धीरे 30 मिनट तक उबालें और 24 घंटे तक इसे अलग रखें। सोडियम कार्बोनेट से इसे मध्यगीकृत करें और 1000 मिलीलीटर तक का अंतिम आयतन तैयार करें, इस विलेयन के 50 मिलीलीटर में 0.05 ग्राम इनवर्ट शक्कर रहता है।
- (vii) मिथिलीन नीला संकेतक - जल में 0.2 प्रतिशत।
- (viii) प्रक्रिया - एआई के तैयार किए गए नमूने के शुद्धता से तोले हुए लगभग 1 ग्राम(एम) को 250 मिलीलीटर के आयतन वाले फ्लास्क में रखें और लगभग 150 मिलीलीटर जल से तनुकृत करें। फ्लास्क के घटकों को अच्छी तरह मिलाएं और जल के साथ 250 मिलीलीटर की मात्रा तैयार करें। अलग पिपेटों का इस्तेमाल करते हुए विलेयन क और विलेयन ख का प्रत्येक का पोर्सीलीनथाल में विशुद्ध 5 मिलीलीटर लें। ब्यूरेट से लगभग 12 मिलीलीटर एआई विलेयन मिलाएं और एसबेस्टस गेज में उबलने तक गर्म करें। 1 मिलीलीटर मिथिलीन नीला संकेतक मिलाएं और 3 मिनट के भीतर अनुमापन पूरा करने के लिए विलेयन को उबालते समय नीले से लाल तक रंग परिवर्तन द्वारा अंतिम छोर का संकेत मिलता रहता है। अनुमापन हेतु अपेक्षित एआई विलेयन के मिलीलीटर में आयतन (एच) नोट करें।

## (ix) परिकलन

$$\text{कुल उपचायक शक्कर, मात्रा का प्रतिशत} = \frac{250 \times 100 \times \text{एस}}{\text{एच} \times \text{एम}}$$

जहां

- एस = कॉपर सल्फेट विलयन की स्ट्रेन्थ  
 एच = अनुमापन के लिए आवश्यक एआई विलयन की मिलीलीटर में  
           आयतन, तथा  
 एम = परीक्षण हेतु लिए गए एआई की ग्राम में मात्रा

## 5.6 सुक्रोज का निर्धारण

(i) प्रक्रिया :- 100 मिलीलीटर स्टॉक एआई विलयन में 1 मिलीलीटर सान्द्रित हाईड्रोक्लोरिक अम्ल डालें तथा लगभग उबलने तक विलयन को गर्म करें। रात भर इसे अलग रखें। इस विलयन का सोडियम कार्बोनेट से मध्यगीकरण करें तथा कुछ उपचायक शक्कर का निर्धारण करें, जैसा कि वर्णित है।

## (ii) परिकलन

(क) सुक्रोज, मात्रा प्रतिशत में = (इनवर्जन के पश्चात् उपचायक शक्कर, मात्रा प्रतिशत में) - (इनवर्जन से पूर्व उपचायक शक्कर, मात्रा प्रतिशत में)  $\times 0.95$

(ख) खपत किए गए प्रत्येक ग्राम पर नाइट्रोजन मिलीग्राम में = 2(ए-बी)-सी

जहां

- ए = परीक्षण हेतु लिए गए सुक्रोज की आरंभिक मात्रा,  
 बी = सुक्रोज की मात्रा, जैसा कि (ए) में परिकलित है, तथा  
 सी = ग्लूकोज के प्रति ग्राम पर नाइट्रोजन की निर्धारित मात्रा।

1. ग. एजोस्पिरिलियम जैव-उर्वरक के विश्लेषण की रीति

1. साधित्र : राइजोबियम के समान
2. अभिकर्मक
- 2.1 मीडियम

### निम्नलिखित संरचना का प्लेटिंग मीडियम प्रयोग करे

|   |               |
|---|---------------|
| डी-मैलिक अम्ल                             | 5.0 ग्राम     |
| पोटेशियम हाइड्रॉक्साईड                    | 4.0 ग्राम     |
| डाई-पोटेशियम हाइड्रोजन फॉस्फेट            | 0.5 ग्राम     |
| फैरस सल्फेट                               | 0.05 ग्राम    |
| मैंगनीस सल्फेट                            | 0.01 ग्राम    |
| मैंगनेशियम सल्फेट                         | 0.1 ग्राम     |
| सोडियम क्लोराईड                           | 0.2 ग्राम     |
| कैल्सियम क्लोराईड                         | 0.1 ग्राम     |
| सोडियम मोलीबडेट                           | 0.002 ग्राम   |
| आसवित जल                                  | 1000 मिलीलीटर |
| बोरोमोथीमोल नीला<br>(0.5% ऐलकोहलिक विलयन) | 2.0 मिलीलीटर  |
| अगर                                       | 1.7 ग्राम     |
| पीएच 6.5 - 7.0 द्वारा समायोजित किया गया   |               |

2.2 प्लेटों के लिए विसंक्रामक और तैयार करने की प्रक्रिया:  
राइजोबियम के समान

### प्लेटिंग मीडियम और निस्सरण (पोरिंग) की तैयारी

#### राइजोबियम के समान

#### 3. प्लेट काउण्ट्स के लिए क्रमिक अवधिश्रण तैयार करना

##### रिजोबियम के समान

4. प्लेट्स का उष्मायन:- वैसा ही जैसा 4.1, पृष्ठ-26 में
- 4.1 प्लेट्स पर लेबल लगाना और 4 से 6 दिनों के लिए 36+1 डिग्री से, पर सिकार्ड
- 4.2 कालोनी गणना सहायता: वैसा ही जैसा 4.2, पृष्ठ-26 गणना

संचारण के पश्चात् जिन ट्यूब्स और प्लेट्स का रंग नीला हो गया है उनकी गणना करना और निर्धारण मीडियम में पेलिकलस की उपस्थिति का पता लगाना। संदेहप्रद वस्तुओं की ऐसी ही जांच पर व्यानपूर्वक सामान्य संदूषण का निर्धारण करना।

नीले रंग में बदल गई सभी प्लेट्स/ट्यूब्स की गिनती करें और उन पर परिकलन के प्रयोजन हेतु विचार करें। कैरियर के प्रति ग्राम सेल्स की संख्या प्राप्त करने के लिए इस तरह के ट्यूब्स/प्लेट्स की गिनती करें और इस गिनती का एम पी एन तालिका अनुबंध ड के साथ मिलान करें।

**अजोस्पिरिलयम गिनती/कैरियर का ग्राम-एमजीएन टेबल वैल्यु<sup>x</sup> अवमिश्रण स्तर**

**उत्पाद का शुष्क आकार**

**1. फास्फेट विलेय जीवाण्डिक जैव उर्वरक के विश्लेषण की रीति**

1. साधित्रः- रिजोबियम के समान
2. अभिकर्मक
- 2.1 मीडियम

निम्नलिखित संरचना का प्लेटिंग मीडियम उपयोग करना:

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| ग्लूकोस                  | 10.0 ग्राम |
| ट्राइ-कैल्सियम फास्फेट   | 5.0 ग्राम  |
| अमोनियम सल्फेट           | 0.5 ग्राम  |
| मैग्नेशियम सल्फेट        | 0.1 ग्राम  |
| सोडियम क्लोराइड          | 0.2 ग्राम  |
| यीर्स्ट एक्स्ट्रैक्ट     | 0.5 ग्राम  |
| मैग्नीस सल्फेट           | ट्रेस      |
| फेरस सल्फेट              | ट्रेस      |
| आसवित जल                 | 1000 एम एल |
| अगर                      | 15.0 ग्राम |
| पीएच 7+/-0.2 तक समायोजित |            |

**2.2. प्लेट्स हेतु विसंक्रमण एवं तैयारी की प्रक्रिया**

रिजोबियम के समान

**प्लेटिंग मीडियम एवं निस्सरण पोरिंग की तैयारी**

रिजोबियम के समान

**3. प्लेट काउण्ट्स के लिए क्रमिक अवमिश्रण तैयार करना**

रिजोबियम के समान

**4. प्लेट्स का उष्यायन:-**

- 4.1 प्लेट्स पर लेबल लगाएं और 4 से 6 दिनों तक 28+1 डिग्री से पर उष्यायन करें।
- 4.2 कालोनी गणना सहायता: रिजोबियम के समान

### गणना

कालोनी काउण्टर की मदद से विलायक जोन के साथ कालोनियों सहित प्लेट्स पर कालोनियों की कुल संख्या की गणना करें।

### विलायक जोन्स की गणना की रीतियां

- क. 90 एम एल पानी में पी एस बी आई (बी एफ) का 10 ग्राम डालें
- ख. 10 तक दस गुना अवमिश्रण श्रखलाएं बनाएं
- ग. गिलोस्कर्ड मीडिया वाले पेट्री डिसेज से मुक्त जीवाणुहीन नलिकाओं का उपयोग करके 10 से 10 अवमिश्रण पर 0.2 एम एल अशेषभाजक (एलिक्चॉट) लें।
- घ. इसे समान रूप से फैलाएं, प्लेट्स को पलट दें और उनका 2 सप्ताह तक 28+/-2 डिग्री से पर उष्णायन करें
- ङ. हैलौ कौन्स दर्शाते हुए कालोनियों की गणना करें और उनके व्यास को मापें। न्यूनतम स्वीकार्य जोन 10 एम एम व्यास है।

### 5. एसकॉर्बिक अम्ल का उपयोग करके विलेय फास्फोरस का निर्धारण

#### 5.1 साधित्र

840 से 880 एन एम पर ट्रांसमिशन मेजरमेंट की क्षमता वाला स्पेक्ट्रोफोटोमीटर।

निष्कर्ष : यह आलसेन सार है।

#### 5.2 अभिकर्मक

अमोनियम मोलिब्डेट [(एन एच ) एम ओ ओ.4एचओ]

एल- एसकॉर्बिक अम्ल

पी- नाईट्रोफेनोल

4 एन एच एस ओ

#### 5.3 अभिकर्मक की तैयारी

##### 5.3.1 सत्फोमोलिब्डिक अमल:-

- 20 ग्राम अमोनियम मोलिब्डेट लें और 300 एम एल आसवित जल में घोलें।
- धीरे धीरे 450 मिलीलीटर 10 एन एच एस ओ डालें।
- उपर्युक्त मिश्रण को ठंडा करें तथा 100 मिलीलीटर एन्टिमनी पोटेशियम टार्टरेट का 0.5 प्रतिशत विलयन डालें
- ठंडा करें तथा आयतन को एक लीटर करें। सूर्य की सीधी रोशनी से अलग कांच की बोतल में रखें।

### 5.3.2 भिश्रित अभिकर्मक को तैयार करना ।

100 मिलीलीटर उपर्युक्त स्टॉक विलयन में 1.5 ग्राम एल-एस्कॉर्बिक अम्ल डालें तथा भिश्राएं । रंग लाने के लिए इस विलयन का 5 मिलीलीटर डालें । भिश्रित अभिकर्मक को ताजा तैयार करना होगा क्योंकि यह 24 घंटे से अधिक समय तक नहीं ठिकता ।

### 5.3.3. प्रक्रिया

- i) 100 मिलीलीटर कोनिकल फ्लास्क में आवश्यक पदार्थ को तोलें ।
- ii) 50 मिलीलीटर एक्स्ट्रैक्टेट डालें तथा रोटरी शेकर पर 30 मिनट तक हिलाएं ।
- iii) वॉटमैन फिल्टर पेपर सं० 40 के जरिए सस्पेंशन को छाने । यदि निस्यंद रंगीन है तो एक चमच डेक्रो-60 (एक्टिवेटिड फॉस्फोरस फ्री कार्बन) डालें, पुनः हिलाएं तथा छाने ।
- iv) अर्क के ज्ञात एलिकॉट (5से25 मिलीलीटर) को 50 मिलीलीटर अनुमापी प्लास्क में लें ।
- v) पी-नाइट्रोफेनोल संकेतक (जल में 1.5 प्रतिशत विलयन) की 5 बूंदें डालें तथा 4एनएच एसओ की सहायता से अर्क को पी एच 2 और 3 के बीच समायोजित करें । पीला रंग गायब हो जाएगा जब विलयन का पी एच 3 बनेगा । आराम से घुमाए ताकि सी ओ के बनने के साथ होने वाली विलयन की हानि से बचा जा सके ।
- vi) जब कार्बन-डाई-ऑक्साईड बनना थम जाए तब फ्लास्क के नैक को धोएं तथा विलयन को लगभग 40 मिलीलीटर तक तनुकृत करें ।
- vii) 5 मिलीलीटर सल्फोमोलीब्डिक अम्ल में एस्कॉर्बिक अम्ल वाला भिश्रित अभिकर्मक डालें, घटकों को हिलाएं तथा आयतन तैयार करें ।
- viii) 880 एम पर 30 मिनट के पश्चात् लाल फिल्टर का प्रयोग करके ट्रांसमिशन को मार्पें । बना हुआ नीला रंग 60 मिनट तक टिका रहता है ।
- ix) मानक कर्व से अर्क में फॉस्फोरस (पी) के सान्द्रण को अभिलिखित करें तथा विलयनशील फास्फोरस के सान्द्रण को निम्नलिखित प्रकार से परिकलित करें :

### 5.3.4 परिकलन

|   |  |
|---|--|
| क) लिए गए पदार्थ का भार   | = एक्स ग्राम   |
| ख) डाले गए एक्स्ट्रैक्टेट का आयतन                                     | = 50 मिलीलीटर  |
| ग) पी निर्धारण के लिए अर्क का आयतन                                    | = वाई मिलीलीटर   |
| घ) रंग आने के बाद बना आयतन  | = 50 मिलीलीटर  |
| ड.) अभिलिखित किए गए प्रतिशत ट्रांसमिशन के मुकाबले मानक कर्व की रीडिंग | = जेडपी पी एम  |
| च) विलयनशील फास्फोरस, प्रतिशत पी                                      | = जेड $\times$ 50 $\times$ 10 $\times$ 50<br>_____<br>वाई.एक्स |

X100

### 5.3.5 मानक कर्व को तैयार करना

50 मिलीलीटर अनुमापी फ्लास्क में 0.1 से 0.6 पी पी एम का प्रयोग करके मानक कर्व तैयार करें। सेमी-लॉग ग्राफ पेपर का प्रयोग करके एक्स-एक्सिस पर विलयनशील फॉस्फोरस के सान्द्रण तथा वाई-एक्सिस पर प्रतिशत टी को लेकर मानक कर्व बनाएं। जब सेमी-लॉग ग्राफ पेपर पर ये बनाए किए जाते हैं तो विलयनशील पी तथा प्रतिशत टी के बीच सीधी रेखा बाला संबंध होता है।

### 6. ब्रॉथ स्टेज पर कल्वर और क्यालिटी कन्ट्रोल का अनुरक्षण और तैयारी

#### 1. राइजोबियम:

##### 1. शुद्ध कल्वरों का अनुरक्षण

1.1 निम्नलिखित संरचना के खमीर अर्के मैनिटॉल अगर स्लांटों पर राइजोबिया के शुद्ध कल्वरों का अनुरक्षण

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| मैनिटॉल                               | 10.0 ग्राम |
| पोटेशियम हाइड्रोजन फॉस्फेट (के एचपीओ) | 0.5 ग्राम  |
| मैग्नेशियम सल्फेट (एमजीएसओ 7 एच ओ)    | 0.2 ग्राम  |
| सोडियम क्लोराइड (एन ए सी 1)           | 0.1 ग्राम  |
| कैल्शियम कार्बोनेट (सी ए सी ओ)        | 1.0 ग्राम  |
| खमीर अर्क                             | 1.0 ग्राम  |
| अगर                                   | 18.0 ग्राम |
| आसवित जल                              | 1 लीटर     |
| पी एच                                 | 6-8-7.0    |

1.2 शुद्ध कल्वर के लूपफुल को संचारण कक्ष में आपूतिक तौर पर प्रत्येक अगर स्लांटों पर अन्तरित करें तथा राइजोबियम की प्रजाति के आधार पर 3 से 10 दिनों के लिए 28+/-2 डिग्री सेन्टीग्रेड पर उष्णायन करें। शुद्ध कल्वरों को सदा 4 डिग्री सेन्टीग्रेड पर रखें।

#### 2. इनोकुलम कल्वरों की तैयारी करना

2.1 1.1 में दी गई संरचना के खमीर मैनिटॉल ब्रॉथ तैयार करें जिसमें अगर न हो।

2.2 कल्वर का लूपफुल अंतरण करें।

3. ब्रॉथ स्टेज पर संस्तुत गुणवत्ता नियंत्रण परीक्षण

3.1 गुणवत्ता परीक्षण

3.1.1. दृश्य संदूषकों से मुक्ति के लिए जांच

3.1.2. बैक्टीरियल ब्रॉथ का पी एच सामान्यतया 6.5 तथा 7.5 के बीच होगा।

3.1.3. स्मेयर तथा ग्राम स्टेन

3.1.3.1. अभिकर्मक

क. अमोनियम ऑक्सलेट क्रिस्टल वायलेट स्टेन में क्रिस्टल वायलेट का भार 0.2 ग्राम होगा तथा 20 मिलीलीटर 95 प्रतिशत इथाईल एल्कोहल धोलें। 0.8 ग्राम अमोनियम ऑक्सलेट को अलग से 80 मिलीलीटर आसवित जल में धोलें। दो विलयनों को मिलाएं तथा फिल्टर पेपर के जरिए छानें।

ख. आयोडीन विलयन

|                  |              |
|------------------|--------------|
| आयोडीन           | 1.00 ग्राम   |
| पोटेशियम आयोडाइड | 2.00 ग्राम   |
| आसवित जल         | 300 मिलीलीटर |

संघटकों का भार तोलें तथा जल में धोलें। फिल्टर पेपर के जरिए छाने।

ग) इरिथ्रोसीन

|            |              |
|------------|--------------|
| इरिथ्रोसीन | 1.00 ग्राम   |
| फिनोल      | 5.00 ग्राम   |
| आसवित जल   | 100 मिलीलीटर |

संघटकों का भार तोलें, आसवित जल में धोलें तथा फिल्टर पेपर के जरिए छानें।

3.1.3.2. प्रक्रिया

माइक्रोस्कोप की साफ स्लाइड पर स्मैयर तैयार करें, हल्के और आवर्तक तापन पर रखें, हवा से ढंडा करें और एक मिनट तक अमोनियम ऑक्सलेट क्रिस्टल वायलेट भर दें। अमोनियम ऑक्सलेट क्रिस्टल वायलेट की अधिकता को हटाने के लिए नल के बहते हुए जल की हल्की धारा से स्लाइड को धोएं। आधे मिनट तक आयोडीन विलयन से स्लाइड को ढकें, अतिरिक्त स्टेन को हटाएं, 95% इथाईल एल्कोहल से स्टेन को धोएं और अंत में नल के बहते हुए जल की हल्की धारा से धोएं। लगभग 3 मिनट तक इरीथ्रोसीन स्टेन से स्लाइड को ढकें, नल के बहते हुए जल की हल्की धारा से धोएं और फिल्टर पेपर की तह के भीतर रखकर सुखाएं। तेल निमंजन पदार्थ का प्रयोग करते हुए कम्पाउंड माइक्रोस्कोप के नीचे स्लाइड की जांच करें।

नोट: अतनूकृत ब्रॉथ से तैयार स्मैयर ग्राम पोसिटिव सेल से मुक्त होना चाहिए। अवसारिक क्षेत्रों में कुछ ग्राम पोसिटिव सेलों की उपस्थिति, जो मीडियम में मृत सेलों के कारण हो सकती है, उसे छोड़ दिया जाए।

3.1.4. ग्लूकोस में वृद्धि की अनुपस्थिति-पेटोन अगर

ग्लूकोस- पेटोन अगर की संरचना निम्नलिखित है:-

|         |            |
|---------|------------|
| ग्लूकोस | 10.0 ग्राम |
|---------|------------|

|                              |                                       |
|------------------------------|---------------------------------------|
| पेटोन                        | 20.0 ग्राम                            |
| सोडियम क्लोराइड (एन ए सी आई) | 5.0                                   |
| अगर (आई एस 6850)             | 15.0                                  |
| आसवित जल                     | 1000 मिलीलीटर                         |
| ब्रोमोक्रेसोल पर्पल          | 10 मिलीलीटर 1.6 प्रतिशत इथाइल एल्कोहल |
| विलेयन                       |                                       |
| पी एच                        | 7.2                                   |

नोट:- जब ब्रॉथ का लूपफुल इस मीडियम में स्ट्रीक किया जाता है और 24 घंटे तक 28+/-2 डिग्री सेंटीग्रेड पर उष्मायन किया जाता है तो भीडियम का पर्पल- वायलट रंग (संकेतक ब्रोमोक्रेसोल पर्पल के कारण) परिवर्तित नहीं होगा । यदि रंग बदलकर पीला (अम्लीय क्रिया) अथवा नीला (क्षारीय क्रिया) हो जाए तो ब्रॉथ संदूषित है । अतः ब्रॉथ को अस्वीकार कर दिया जाए ।

### 3.1.5 खमीर अर्क मैनिटोल अगर पर कोंगो लाल के साथ स्ट्रीक करना ।

जब ब्रॉथ कल्वर का लूपफुल इस मीडियम की प्लेट पर स्ट्रीक कर दिया जाता है तथा 3 से 10 दिनों के लिए 28+/-2 डिग्री सेंटीग्रेड पर उष्मायन किया जाता है, तब यह उसी वृद्धि की विशेषताओं वाली बैक्टीरिया की कलोनियों को दर्शाएगा जैसी विशेषताएं ब्रॉथ की तैयारी में प्रयुक्त शुद्ध कल्वर में हो, अन्यथा ब्रॉथ को अस्वीकार कर दिया जाना चाहिए ।

## 3.2 मात्रात्मक परीक्षण

### 3.2.1 वायबल अथवा प्लेट काउन्ट्स

10 से 10 तक के तनूकृत घोल प्राप्त करने के लिए ब्रॉथ के एक मिलीलीटर को क्रमिक तौर पर तनूकृत करें । वाई ई एम ए प्लेटों पर तनूकृत घोलों के 0.2 मिलीलीटर एलिकॉट्स को रखें तथा राइजोबियम की प्रजाति के आधार पर 2 से 6 दिनों के लिए 28+/-2 डिग्री सेंटीग्रेड पर उष्मायन करें । शेक कल्वर अथवा फर्मेन्टरों से प्राप्त अंतिम ब्रॉथ में वायबल राइजोबियम के काउन्ट्स 10 से 10 सेल/मिलीलीटर से कम नहीं होने चाहिए, अन्यथा ब्रॉथ को अस्वीकार किया जाना चाहिए ।

## 2. एजोस्पीरिलियम

### 1. शुद्ध कल्वरों का अनुरक्षण

- 1.1 नाइट्रोजन मुक्त ब्रोमोथाइमोल नीले भीडियम पर एजोस्पीरिलियम के शुद्ध कल्वर का तथा अर्ध-ठोस भीडियम के रूप में अनुरक्षण करें।
  
  - 1.2 शुद्ध कल्वर के लूपफुल को संचारण कक्ष में आपूर्तिक तौर पर प्रत्येक अगर कल्वर ट्यूब में अन्तरित करें तथा तीन दिनों तक  $3+2$  डिग्री सेन्टीग्रेड पर उष्मायन करें और इसे स्थिर रखें। शुद्ध कल्वर को सदा 5 डिग्री सेन्टीग्रेड से नीचे रखें।
  
  2. इनोकुलम कल्वर और मास कल्वर तैयार करना:  
इस मानक के इनोकुलम कल्वर और मास कल्वर को इस मानक के राइजोबियम के लिए वर्णित प्रक्रिया की तरह तैयार किया जाए।
  
  3. ब्रॉथ स्टेज पर संस्तुत गुणवत्ता नियंत्रण परीक्षण।
    - 3.1 गुणवत्ता परीक्षण
      - 3.1.1. स्लाइड तैयार करके तथा माइक्रोस्कोप के नीचे प्रेक्षण करके संदूषकों से मुक्ति के लिए जांच
      - 3.1.2. बैक्टीरियल ब्रॉथ का पी एच सामान्यतया 7.0 से 8.0 के बीच हो।
      - 3.1.3. इस मानक के राइजोबियम के लिए वर्णित प्रक्रिया की तरह ग्राम स्टेनिंग परीक्षण किया जाए।
      - 3.1.4. संचारण से 24 घंटों के बाद भीडिया में रंग परिवर्तन को देखें। रंग हरे से नीले में बदल जाएगा।
      - 3.1.5. भीडिया की सतह से ठीक नीचे पेलीकल को देखें। संचारित ब्रॉथ को स्थिर रखने के तीन दिन के पश्चात् इसकी जांच की जाती है।
    - 3.2. गुणवत्ता परीक्षण
      - 3.2.1. सर्वाधिक सम्भावित संख्या (एमपीएन) अनुबंध-ड में दी गई है। अवधूनन (शेक) कल्वर अथवा किण्वक (फेरमेन्टोएस) से अंतिम चूष (ब्रॉथ) में एजोस्प्रिलियम की गिनती  $10^8$  से  $10^9$  सैल/एमएल से कम नहीं होगी अन्यथा चूष (ब्रॉथ) को अस्वीकार किया जाना चाहिए।
- 2. ख. एजोटोबैक्टर**
1. शुद्ध कल्वर का अनुरक्षण
    - 1.1 निम्नलिखित संघटन के स्लेंटो पर एजोटोबैक्टर के शुद्ध कल्वरों का अनुरक्षण करना
 

|         |          |
|---------|----------|
| एगर     | 20 ग्राम |
| सूक्रोज | 20 ग्राम |

|                           |             |
|---------------------------|-------------|
| फरस सल्फेट                | 0.1         |
| डाइबोसिक पोटासियम फास्फेट | 1.0 ग्राम   |
| मैग्नेसियम सल्फेट         | 0.5 ग्राम   |
| कैलसियम कार्बोनेट         | 2.0 ग्राम   |
| सोडियम मोलिब्डेट          | 0.005 ग्राम |

1.2 संरोपक कक्ष में अपूरित रूप से अगर स्लेंटो में से प्रत्येक के शुद्ध कल्वर को लूपफूल में अंतरित करना और एजोटोबैक्टर की किस्म के आधार पर 3 से 10 दिनों के लिए 28+/-2 डिग्री सेंटीग्रेड पर उष्णायन करना। हमेशा कल्वरों को 5°सेंटीग्रेड पर शुद्ध कल्वर रखें।

## 2. इनोकुलम कल्वर तैयार करना

2.1 कम्पोजिटर का जेन्सेन्स मीडिया ब्रोथ तैयार करना जैसा कि 1.1 में दिया गया है घटा (-) अगर

2.2 कल्वर को एक 100 एमएल/250 एम के लूप फुल में अंतरित करना; ब्रोथ वाला कोनिकल फ्लास्क। रोटेरी शोकर पर 2 से 6 दिनों के लिए 28+/-2 डिग्री सेंटीग्रेड पर फ्लास्क को उष्णायन करना।

3. ब्रोथ चरण द्वारा संस्तुत गुणवत्ता नियंत्रण परीक्षण।

### 3.1 मात्रात्मक परीक्षण

3.1.1 स्लाइड तैयार करके और माइक्रोस्कोप के नीचे निरीक्षण करके अंतर्वेशन से मुक्ति हेतु जांच।

3.1.2 जीवाणु ब्रोथ द्वारा पीएच सामान्य तौर पर 6.5 से 7.0 के बीच होगा।

3.1.3 ग्राम अभिरंजन परीक्षण किया जाएगा जैसा कि इस मानक के रिजोबियम के लिए वर्णित है।

### 3.2 मात्रात्मक परीक्षण

3.2.1 जीवनक्षम सेल गिनती रिजोबियम की तरह।

## 4. पैक करना, थिन्ह लगाना, भण्डारकरण और उपयोग

### 4.1 पैक करना

जैव उर्दरक को पालिथिलीन पैकों में पैक किया जाएगा जिसकी मोटाई 75-100 माईक्रोन से कम नहीं होगी।

#### 4.2 चिन्ह लगाना

प्रत्येक पोलिथिलीन पैक को निम्नलिखित सूचना के साथ स्पष्ट और स्थायी रूप से चिन्ह लगाया जाएगा:

- (क) उत्पाद का नाम
- (ख) विनिर्माता का नाम और पता;
- (ग) फसल (फसलों) जिसके (जिनके) लिए आशयित हैं;
- (घ) प्रत्युक्त वाहक का प्रकार;
- (ङ) बैच संख्या;
- (च) विनिर्माण की तारीख;
- (छ) समाप्ति की तारीख जो विनिर्माण की तारीख से 6 माह से अधिक नहीं होगी;
- (ज) वास्तविक मात्रा कि०ग्रा०/ग्राम में और कितने क्षेत्र के लिए है;
- (झ) भण्डारण अनुदेश इन शब्दों में व्यक्त हो;
- "सूरज की सीधी रोशनी और ताप से दूर ठंडे स्थान में रखें"
- (अ) भार और तोल (पैकेज्ड वस्तु) नियम, 1977 के मानकों के अधीन कोई अन्य अपेक्षित सूचना ।

4.3 मद (ग), (च) और (छ) का रंगीन इंक बैकग्राउण्ड पर प्रिंट किया जाएगा ।

4.4 पैकेटों पर निम्नलिखित अनुसार, संक्षेप में जैव उर्वरक के उपयोग के लिए निर्देश प्रिंट किया जाएगा ।

"पैकेट की अंतर्वस्तुएं प्रसारित किए जाने वाले क्षेत्र के लिए अथवा विनिर्दिष्ट फसलों पर आधारित जड़ ढुबाने (रूट डिपिंग) के लिए दी गई पौदें बीजोपचार हेतु काफी पर्याप्त हैं जैसा कि पैकेट पर सूचित किया गया है । इनोकुलैण्ट्स को आराम से बीजों के साथ थोड़े से पानी में मिलाएं और ध्यान रखें कि बीज के ऊपरी भाग को क्षति न पहुंचे । संरोपित बीज को साफ सतह वाले टाट (बोरा) के थैले पर छाया में सुखाएं और उन्हें तुरंत बो दें ।

केवल उल्लिखित फसलों के लिए उपयोग करें । समाप्ति की तारीख से पहले उपयोग करें और सूरज की सीधी रोशनी अथवा ताप में न रखें ।

जैव उर्वरक कोई रासायनिक उर्वरक नहीं है अतः कृषि-रसायनों के साथ संरोपित बीज के साथ न मिलाएं अथवा इनोकुलैट न करें ।"

#### 4.5 भण्डारकरण

इनोकुलेण्ट को विनिर्माता द्वारा सीधे ताप से दूर अधिमानतः 20 डिग्री सेंटीग्रेड के तापमान पर ठंडे और सूखे स्थान में रखा जाएगा । विनिर्माता का यह कर्तव्य भी होगा कि वे भण्डारकरणके दौरान रखी जाने वाली पूर्वविधानी के बारे में खुदरा विक्रेताओं और इसके उपरांत उपभोक्ताओं को बताएं ।

अनुसूची-IVजैविक उर्वरक

**आमुखः-** यह अनुसूची कंटेनरों पर विनिर्देशन, विनिर्माता, बिक्री व वितरण, पैकिंग व विपणन तथा जैविक उर्वरकों के विश्लेषण इत्यादि से संबंधित है।

परिभाषा:-

**(ख) जैविक उर्वरकः-** जैविक उर्वरक ऐसे उपादान हैं जो एक अथवा अधिक जैविक प्राकृतिक (पौध/पशु) की (अ) प्रसंस्कृत सामग्री (यो) के बने हुए हैं और इसमें ऐसी अप्रसंस्कृत खनिज सामग्रियां मिली हो सकती हैं जिसे माइक्रोबायोलोजिकल डीकम्पोजिंग प्रक्रिया के माध्यम से परिवर्तित किया गया है।

अनुसूची-IV(खंड 2 (ज) और खंड 2 (थ) देखें)भाग-कजैविक उर्वरक का विनिर्देशन1. सिटी कम्पोस्टः

|   | भाग-क                 |  |
|---|-----------------------|--|
| <b>जैविक उर्वरक का विनिर्देशन</b>           |                       |  |
| <b>1. सिटी कम्पोस्टः</b>                    |                       |  |
| (i) वजन द्वारा आर्द्रता प्रतिशत             | 15.0-25.0             |  |
| (ii) रंग                                    | गहरा भूरा से काला     |  |
| (iii) गंध                                   | बुरी गंध से मुक्त     |  |
| (iv) कण आकार                                | न्यूनतम 90% सामग्री   |  |
|   | 4.0 एमएम आईएस         |  |
|   | छलनी से छन जाना चाहिए |  |
| (v) आयतन घनत्व (जी/सीएम3)                   | 0.7-0.9               |  |
| (vi) कुल जैविक कार्बन,                      | 16.0                  |  |
| वजन द्वारा प्रतिशत, न्यूनतम                 |                       |  |
| (vii) कुल नाइट्रोजन (एन के रूप में)         | 0.5                   |  |
| वजन द्वारा प्रतिशत, न्यूनतम                 |                       |  |
| (viii) कुल फॉस्फेट्स ( $P_2O_5$ के रूप में) | 0.5                   |  |
| वजन द्वारा प्रतिशत, न्यूनतम                 |                       |  |
| (ix) कुल पोटाश ( $K_2O$ के रूप में)         | 1.0                   |  |
| वजन द्वारा प्रतिशत, न्यूनतम                 |                       |  |
| (x) सी:एन अनुपात                            | 20:1 या कम            |  |

|        |  |           |
|--------|--|-----------|
| (xi)   | पीएच   | : 6.5-7.5 |
| (xii)  | चालकता (डीएसएम-1 के रूप में)<br>से अनधिक   | 4.0       |
| (xiii) | पैथोजेन्स  | शून्य     |
| (xiv)  | भारी धातु वस्तु (मि०ग्रा०/कि०ग्रा० के रूप में)<br>वजन द्वारा प्रतिशत, अधिकतम<br>आर्सेनिक (एस2 ओ3 के रूप में) | 10.00     |
|        | काडमियम (सीडी के रूप में)  | 5.00      |
|        | क्रोमियम (सीआर के रूप में)   | 50.00     |
|        | तांबा (सीयू के रूप में)  | 300.00    |
|        | मर्करी (एचजी के रूप में)   | 0.15      |
|        | निकेल (एनआई के रूप में)  | 50.00     |
|        | सीसा (पीबी के रूप में)   | 100.00    |
|        | जिंक (जेडएन के रूप में)  | 1000.00   |

## 2. वर्मि कम्पोस्ट:

|        |  |   |
|--------|--|---|
| (i)    | वजन द्वारा आर्द्धता प्रतिशत  | 15.0-25.0   |
| (ii)   | रंग  | गहरा भूरा से काला   |
| (iii)  | गंध  | बुरी गंध से मुक्त   |
| (iv)   | कण आकार  | न्यूनतम 90% सामग्री<br>4.0 एमएम आईएस<br>छलनी से छन जाना चाहिए |
| (v)    | आयतन घनत्व (जी/सीएम3)  | 0.7-0.9   |
| (vi)   | कुल कार्बनिक कार्बन,<br>वजन द्वारा प्रतिशत, न्यूनतम  | 18.0  |
| (vii)  | कुल नाइट्रोजन (एन के रूप में)  | 1.0   |
| (viii) | कुल फॉस्फेट्स (पी 2 ओ5 के रूप में)   | 1.0   |
| (ix)   | कुल पोटाशियम (के2 ओ के रूप में)  | 1.0   |
| (x)    | भारी धातु वस्तु (मि०ग्रा०/कि०ग्रा० के रूप में)<br>वजन द्वारा प्रतिशत, अधिकतम<br>आर्सेनिक (एस2 ओ3 के रूप में) | 10.00<br>5.00   |

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| क्रोमियम (सीआर के रूप में) | 50.00  |
| मर्करी (एचजी के रूप में)   | 0.15   |
| निकेल (एनआई के रूप में)    | 50.00  |
| सीसा (पीबी के रूप में)     | 100.00 |

### 3. प्रेसमड़:

|  |             |
|--|-------------|
| (i) वजन द्वारा आर्द्रता अधिकतम                       | 15.0 - 25.0 |
| (ii) कुल नाइट्रोजन (एन के रूप में)                   | 1.80        |
| वजन द्वारा प्रतिशत, न्यूनतम                          |             |
| (iii) कुल फॉस्फोरस (पी2ओ5 के रूप में)                | 2.00        |
| वजन द्वारा प्रतिशत, न्यूनतम                          |             |
| (iv) सी:एन अनुपात न्यूनतम                            | 10:1        |
| (v) कुल पोटासियम (के 2ओ के रूप में)                  | 1.40        |
| वजन द्वारा प्रतिशत, न्यूनतम                          |             |
| (vi) पीएच  | 7.0-8.0     |
| (vii) भारी धातु वस्तु (मिंग्रा०/किंग्रा० के रूप में) |             |
| वजन द्वारा प्रतिशत, अधिकतम                           |             |
| आर्सेनिक (एएस2ओ3 के रूप में)                         | 10.00       |
| काडमियम (सीडी के रूप में)                            | 5.00        |
| क्रोमियम (सीआर के रूप में)                           | 50.00       |
| तांबा (सीयू के रूप में)                              | 300.00      |
| मर्करी (एचजी के रूप में)                             | 0.15        |
| निकेल (एनआई के रूप में)                              | 50.00       |
| सीसा (पीबी के रूप में)                               | 100.00      |
| जिंक (जेडेएन के रूप में)                             | 1000.00     |

### भाग-ख

#### कार्बनिक उर्वरक की सहन सीमा

यौगिक नाइट्रोजन, फास्फोरस और पोटासियम न्यूट्रिंस के लिए 0.1 यूनिट

### भाग-ग

#### कार्बनिक उर्वरकों के नमूने लेने की प्रक्रिया

(एफ जी ओ, 1985 की अनुसूची-II भाग-क के अधीन यथा वर्णित पद्धति के अनुसार)

निरीक्षक अनुसूची-II भाग क के अधीन वर्णित प्रक्रिया के अनुसार ही किसी कार्बनिक उर्वरक का नमूना लेंगे।

भाग - घ

कार्बनिक उर्वरकों के विश्लेषण की रीति

**1. पीएच का आंकलन**

- 50 एम एल आशवित जल में 25 ग्राम कम्पोस्ट मिलाकर रोटरी शेकर से 2 घंटे हिलाइये
- वाटमैन नं० 1 फिल्टर पेपर या समतुल्य किसी फिल्टर पेपर का प्रयोग करके बचनर कीप से इसको छानिये
- छाने हुए भाग का पीएच मीटर का प्रयोग करते हुए पीएच मान ज्ञात कीजिए।

**2. नमी का आंकलन**

रीति: एक तौली हुई, साफ तथा शुष्क पेट्री डिश में लगभग 5 ग्राम तैयार नमूना निकटतम मिठारो में तौलिए। इसे ओवेन में 65 +, 1 डिग्री सेंटीग्रेड पर लगभग 5 घंटे ओवन में गरम कीजिए फिर डेसीकेटर में ठंडा करके इसे तौलिये इसके भार में आयी कमी को नोट करिये यह भाग नमी का होता है।

परिकलन:

$$\text{भार के आधार पर नमी की प्रतिशतता} = \frac{100 (\text{बी- सी})}{\text{बी- ए}}$$

ए = पेट्री डिश का भार

बी = पेट्री डिश जमा सुखाने के पहले पदार्थ का भार

सी = पेट्रीडिश जमा सुखाने के पश्चात पदार्थ का भार

**3. 'बल्क आवश्यकताएं डेन्सिटी' का आंकलन**

- 100 एमएल का एक मापक सिलिंडर - भारतुला
- रबर पैड (1 वर्ग फुटः 1 इंच मोटा) हाट एयर ओवन

रीति

- एक शुष्क 100 एम एल सिलिण्डर को तौल लीजिए (डब्ल्यू आई गिल)
- सिलिंडर को 100 एमएल चिन्ह तक नमूने से भर लीजिए। आयतन नोट कीजिए (वीआई एगएल)
- नमूने के साथ सिलिंडर को तौल लिजिए (डब्ल्यू 2 ग्राम)
- दो मिनट तक सिलिण्डर को बंद कर दीजिए
- संघटित आयतन को माप लिजिए (वी 2 एमएल)

परिकलन

बल्क डेन्सिटी =

$$4 \text{ इंच का आंकलन- } \frac{\text{लिए गए नमूने का भार (डब्ल्यू 2- डब्ल्यू 1)}}{\text{आयतन (वी 1- वी 2)}}$$

### आवश्यकताएं

- 250 एमएल फ्लास्क फनेल (ओ डी- 75 एमएम)
- 100 एमएल बीकर विश्लेषणात्मक शेष
- पौटीशियम क्लोराइड फिल्टर पेपर  
(एआर ग्रेड)
- कन्डक्टिवी मीटर (टेम्परेचर कम्पेन्सेशन सिस्टम युक्त)

### रीति-

- 2-4 मिमी० की छलनी से कार्बनिक उर्वरक के जैविक नमूने को छान लीजिए
- इसमें से 20 ग्राम नमूना लीजिए और 100 एमएल आसवित पानी में मिला लीजिए जिससे इसका अनुपात 1:5 हो जाए।
- थोड़े-थोड़े समय पर इसको 1 घंटे तक हिलाते रहे।
- 0.01 एम पौटीशियम क्लोराइड विलयन का प्रयोग करते हुए कडकिटिविटी मीटर को ठीक कर लीजिए।
- बिना छाने हुए कार्बनिक उर्वरक के विलयन की कडकिटिविटी को माप लीजिए।

### परिकलन

परिणाम को 25 सेंटीग्रेड पर मिलीम्हो या डीएस/सीएम में व्यक्त कीजिए और कार्बनिक उर्वरक विलयन की सान्द्रता का स्पष्ट कीजिए जैसे कि : 1:5 जैविक उर्वरक विलयन

### 5. कार्बनिक कार्बन का आंकलन

#### उपकरण

- (i) कोनिकल प्लास्क 500 एमएल
- (ii) पिपेट्स- 2, 10 और '20 एमएल
- (iii) व्यूरेट- 50 एमएल

### अभिकर्मक

- (i) फास्फोरिक एसिड (आर्थो)- 85%
- (ii) सोडियम फ्लोराइड विलयन- 2
- (iii) सल्फ्यूरिक एसिड ए आर 96% जिसमें 1.25 एजी 2 एसओ 4 मिला हो।
- (iv) मानक आई एन के 2 सी आर 2 0 7 11 लीटर पानी में 49.04 ग्राम के 2 सीआर 2 0 7 मिलाकर घोल लीजिए।
- (v) मानक 0.5 एन फेरस अमोनियम सल्फेट- 800 एमएल पानी में 196.1 ग्राम एफई (एनएच4 एच (एसओ 4) 2. 6 एच 2ओ 20 एमएल सान्द्र (एच 2 एसओ 4) घोल लीजिए।
- (vi) डाईफेनाइलामन संकेतक- 20 एमएल पानी और 100 एमएल सान्द्र एच 2 एसओ 4 में 0.5 ग्राम अर्थिकर्मक श्रेणी का डाईफेनालामाइन का घोल तैयार कीजिए।

### प्रक्रिया

हवा में सुखी हुई कम्पोस्ट को पीस लीजिए और 80 मेस (2 मिमो छलनी) से छान लीजिए। 500 एमएल कोनिकल फ्लास्क में 0.5 ग्राम नमूना ले लीजिए। व्यूरेट की सहायता से इसमें 50 एमएल आई (एन) के 2 सीआर 2 ओ 7 मिलाकर थोड़ा हिला लीजिए। फिर इसमें 50 एमएल सान्द्र एच 2 एसओ 4 मिलाकर 2-3 बार हिलाइये। इसे 30 मिनट तक अंधेरी जगह पर रख दीजिए फिर इसमें 200 एमएल पानी मिलाइए। इसमें से 50 एमएल एलिकाट (0.1 ग्राम नमूने के बराबर) दूसरे 500 एमएल वाले कोनिकल फ्लास्क में ले लीजिए। इसमें 15 एमएल आर्थोफास्फोरिक अम्ल और 1 एमएल डाइफेनाइलामान संकेतक मिला लीजिए। 0.5 एन फेरस अमोनियम सल्फेट से इसका तब तक टाइट्रेट करिये जब तक कि इसका रंग नीले वैगनी से हरा न हो जाए। साथ ही साथ यही प्रयोग बिना कम्पोस्ट के नमूने का करिये।

### परिकलन

$$10 \text{ (बीटी)} \times 0.003 \times 100 \times 1.3$$

|  |  |
|--|--|
| बी   | नमूने का भार   |
| कार्बनिक कार्बन % =  |  |
| जहां पर बी-  | ब्लैंक टाइट्रेशन के लिए  |
|  | अपेक्षित फेरस अमोनियम सल्फेट                                       |
|  | विलयन का आयतन (एमएल)   |
| टी-  | नमूने के लिए अपेक्षित फेरस अमोनियम सल्फेट का आयतन                  |
| स्रोत-   | टण्डन, मेथड्स आफ सोयल, प्लांट, फर्टिलाइजर एंड वाटर एनलिसिस पेज- 16 |
| 7.   | कुल नाइट्रोजन का आकलन  |
| जैसा कि एफसीओ (1985) की अनुसूची-II, भाग-बी, 3 (V) में वर्णित है। |  |
| 8.   | सी एन के अनुपात का आकलन  |

#### रीति-

सी: एन अनुपात का परिकलन कुल नाइट्रोजन मूल्य में कार्बनिक कार्बन मूल्य का भाग देकर कीजिए।

#### 9. फास्फेट का आकलन

जैसा एफसीओ (1985) की अनुसूची-II, भाग बी, 4 (डी) (II) में वर्णित है।  
टिप्पण: टाइट्रेशन के लिए अंतिम एलिकाट में पी 2 ओ 5 सांद्रता होनी चाहिए।

#### 10. पोटैशियम का आकलन

#### फ्लेम फोटोमैट्री रीति

कुल पोटैशियम का आकलन 650-700 डिग्री सेंटीग्रेड ताप पर ड्राई एशिग करके तथा सान्द्र हाइड्रोक्लोरिक अम्ल में विलयन तैयार करके किया जाता है।

#### अभिकर्मक और मानक वक्र

(1) पोटैशियम क्लोराइड मानक विलयन: लीटर आसवित जल में 1.909 ग्रा० ए आर श्रेणी के पोटैशियम क्लोराइड (1 घंटे तक 60 डिग्री सेंटीग्रेड पर सुखाया हुआ) 1000 पीपीएम के का विलेयन

तैयार कीजिए। 1000 पीपीएम विलयन में से 100 एमएल वियलेन मिलाकर 1 लीटर निष्कर्षित विलयन के साथ 100 पीपीएम मानकर विलयन तैयार कीजिए।

**2. मानक वक्रः** 100 पीपीएम विलयन में से 0,5,10,15 और 20 एमएल पिपेट से लेकर 100 एमएल वाल्यूमेट्रिक फ्लास्क में मिला लीजिए और ताकि इसका आयतन चिन्ह तक पहुंच पाए। अब इसमें क्रमशः 0,5,15 तथा 20 पीपीएम के उपस्थित है।

### प्रक्रिया

- \* एक पोर्सिलीन की कटोरी में 5 ग्राम नमूना ले लीजिए और मुहबन्दभट्टी में पदार्थ को 650-700 सेंटीग्रेड पर गरम करके राख तैयार कर लीजिए।
- \* इस ठंडा कर लीजिए और 5 एमएल सान्द्र हाइड्रोक्लोरिक एसिड में घोल लीजिए। इसे 250 एमएल के बीकर में डालकर आसवित जल से कई बार धो लीजिए और फिर इसको गर्म करिये। फिर इसे 100 एमएल अनुभाषी फ्लास्क में रखकर आयतन माप लीजिए।
- \* यदि जरूरी हो तो विलयन को छान लीजिए और छने हुए भाग में आसवित जल मिलाकर इसे इतना पतला करिये कि प्रयोग किए जाने वाले विलयन में के की मात्रा 0 से 20 पीपीएम हो जाए।
- \* उपकरण को ठीक तथा संतुलित करने के पश्चात के फिल्टर का प्रयोग करते हुए फ्लेम फोटोमीटर द्वारा के का मापन करिये।
- \* फ्लेम फोटोमीटर में मानक विलयन में के की विभिन्न सान्द्रता को इसी प्रकार पढ़िये और के की विभिन्न सांद्रता को पढ़ते हुए प्लॉटिंग द्वारा मानक वक्र तैयार कीजिए।

**परिकलन-** पोटाश (के) भार के अनुसार प्रतिशत = आर  $\times$  20  $\times$  तनु बनाने वाले कारक जहां आर = नमूना विलयन में के का पीपीएम (मानक वक्र में अतिरिक्त निर्देशांकन से प्राप्त)

### 11. भारी धातुओं का आकलन

**आर्सेनिक-** जैसा कि एफसीओ (1985) की अनुसूची- || भाग-बी, 3 (XIV) में वर्णित है।

**कैडमियम-** जैसा कि एफसीओ (1985) की अनुसूची- || भाग-बी, 8 (X) में वर्णित है।

**तांबा-** जैसा कि एफसीओ (1985) की अनुसूची- || भाग-बी, 8 (IV) में वर्णित है।

**सीसा-** जैसा कि एफसीओ (1985) की अनुसूची- || भाग-बी, 8 (V) में वर्णित है।

**जस्ता-** जैसा कि एफसीओ (1985) की अनुसूची- || भाग-बी, 8 (II) में वर्णित है।

### क्रोमियम एवं निकेल

#### आवश्यक सामग्री

(क) ट्राईएसिड मिश्रण: 10 भाग एचएन ओ 3 (नाइट्रिक अम्ल)

1 भाग एच 2 एसओ 4 (सल्फ्यूरिक अम्ल) और

4 भाग एचसीएल ओ 4 (परक्लोरिक अम्ल), मिलाएं

(ख) कोनिकल फ्लास्क, 250 एमएल

(ग) हाट प्लेट

(घ) वाटमैन फिल्टर पेपर नं० 42

(ङ) एटोमिक एब्जार्सन स्पेक्ट्रोफोटोमीटर (एएएस)

### **नमूने का प्रसंस्करण**

ओवन में (105 डिग्रीसेंटीग्रेड) सुखाए गए नमूने का 0.5 ग्राम या उपयुक्त मात्रा, जो कि पूरी तरह पिसी हो और 02 एमएम छलनी से छानी गई हो, को एक कोनिकल फ्लास्क में ले लीजिए।

30 एमएल ट्राईएसिड मिश्रण ले लीजिए और इसे छोटे ग्लास फनेल से ढक लीजिए। नमूने को हाट प्लेट पर 200 डिग्रीसेंटीग्रेड तक गरम करिये जिससे कि विलयन लगभग आधा हो जाए और सफेद अवक्षेप बैठ जाए।

ठंडा करके हाटमैन नं० 42 फिल्टर पेपर से नमूने को छानकर अनुमापी फ्लास्क में 100 एमएल मिश्रण ले लिजिए।

### **मापन**

उपकरण के लिए दी गई प्रक्रिया के अनुसार एटोमिक एब्जार्सन स्पेक्ट्रोफोटोमीटर (एएएस) का प्रयोग करते हुए सीडी, सीयू, सीआर, एफई, पीबी, एनआई, जेडएन धातु की सान्द्रताओं का मापन किया जाता है। यही प्रक्रिया अपनाते हुए ब्लैंक परीक्षण कीजिए।

### **परिणामों को व्यक्त करना**

धातु की सान्द्रता को 3 डेसीमल यूनिटों में भार के आधार पर ओवन में सुखाए जाने के बाद मिंग्रा०/ग्राम के आधार पर व्यक्त करिये।

(संदर्भ- मैन्यूअल फार एनलिसिस ऑफ म्यूनिसिपल सालिड वेस्ट (कम्पोस्ट)- सॉट्रल पोल्यूशन कंट्रोल बोर्ड)

### **पारा**

#### **अभिकर्मक**

- (क) सांद्र नाइट्रिक अम्ल (एचएन ओ 3)
- (ख) सान्द्र सल्फ्यूरिक अम्ल (एच 2 एसओ 4)
- (ग) पोटैशियम परसल्फेट (5% विलयन): 1 लीटर आसवित जल में 50 ग्राम के 2 एस 2 ओ 8 का घोल तैयार करिये।
- (घ) पोटैशियम परमैग्नेट (5% विलयन): एक लीटर आसवित जल में 50 ग्राम के एमएन ओ 4 का घोल तैयार कीजिए
- (ङ) हाइड्राक्सीलेमाइन सोडियम क्लोराइड

**विलयन-** 1 लीटर आसवित जल में 120 ग्राम हाइड्राक्सिल अमीन साल्ट और 120 ग्राम सोडियम क्लोराइड (एनएसीएल) का घोल तैयार कीजिए।

- (च) स्टैनस क्लोराइड (20%) 100 एमएल आसवित जल में 20 ग्रा० एसएनसीएल 2 का घोल तैयार कीजिए।

**आवश्यक सामग्री**

- (क) वाटर बाथ
- (ख) फ्लेमलेस एटोमिक एब्जार्सन स्पेक्ट्रोफोटोमीटर या कोल्ड वेपर मर्करी एनलाइजर
- (ग) बीओडी बाटल, 300 एमएल

**नमूने का प्रसंस्करण**

- (क) 5 ग्राम नमूना लेकर (जो पूरी तरह पिसा हो और सूखा न हो) ओवेन में 105 से० पर 8 घंटे तक गर्म करिये ताकि नमी समाप्त हो जाए।
- (ख) 5 ग्राम का दूसरा नमूना (जो पूरी तरह पिसा हो और सूखा न हो) बीओडी बाटल में लीजिए इसमें 2.5 एमएल सांद्र एचएनओ 3, 5 एमएल सांद्र एच 2 एसओ 4 और 15 एमएल 15% केएमएन ओ 4 को मिलाइये।
- (ग) इसमें 15 मिनट बाद 8 एमएल 5% के 2 एस 2 ओ 8 मिलाइए।
- (घ) बाटल को ढक्कन से बंद कर दीजिए और इसे 95 डिग्रीसेंटीग्रेड पर 2 घंटे तक वाटर बाथ में रखिये।
- (ड) इसे कमरे के ताप तक ठण्डा करके इसमें 5 एमएल हाइड्राक्सीलेमाइन सोडियम क्लोराइड विलेयन मिलाइये।

**मापन**

कोल्ड वेपर मर्करी एनलाइजर का प्रयोग करके, रीडिंगों के लेने के तत्कालपूर्व 20% एसएन सीएल 2 का 5 एमएल के साथ नमूने का रिडक्शन कराइये।

परिणामों को व्यक्त करना

पारे की सांद्रता को 3 डेसीमल ईंकाई में ओवन में सूखाये गये शुष्क भार के आधार पर मि० ग्राम/ग्राम में व्यक्त करिये।

(संदर्भ: मैन्यूअल फार एनलिसिस आफ म्यूनिसिपल सालिड वेस्ट (कम्पोस्ट)- सेंट्रल पोल्यूशन कन्ट्रोल बोर्ड)

16. उक्त आदेश में प्रारूप 'घ' के स्थान पर निम्नलिखित प्रारूप रखा जाएगा, अर्थात्

**"प्रारूप घ"**

**(दख्यों खण्ड 14 (2) तथा 18 (1))**

कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक के भौतिक/दानेदार मिश्रण वाले उर्वरक के विनिर्माण के लिए प्रमाण पत्र अभिप्राप्त करने के लिए आवेदन पत्र का प्रारूप सेवा में,

रजिस्ट्रीकरण प्राधिकारी

स्थान:

राज्य:

1. आवेदक का पूरा नाम और पता-
2. क्या आवेदक उर्वरक नियंत्रण आदेश 1985 के खंड 14 के उप-खंड (1) के अधीन राज्य सरकार द्वारा विहित योग्यता रखता है-
3. क्या आवेदक नया व्यक्ति है ? (हाँ या ना में लिखिए)-

4. उस परिसर की अवस्थिति जहां कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक के भौतिक/दानेदार मिश्रण तैयार किए जाएंगे-
5. जिनके लिए प्रमाणपत्र अपेक्षित है उन उर्वरकों/कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक के भौतिक/दानेदार मिश्रण के विर्निदेश और ऐसा मिश्रण तैयार करने के लिए आवश्यक कच्चा माल संबंधित पूरे ब्यौरे
6. किसी अन्य विनिर्माण प्रमाणपत्र का पूरा ब्यौरा, यदि कोई हो, जिसे किसी अन्य रजिस्ट्रीकरण प्राधिकारी द्वारा जारी किया गया हो ;
7. आवेदक कितने दिनों से उर्वरकों/कार्बनिक उर्वरक/सूक्ष्म पोषक तत्व वाले उर्वरकों के जैव उर्वरक मिश्रण के भौतिक/दानेदार मिश्रण तैयार करने के कारबार में लगा हुआ है ?
8. आवेदन की तारीख को मेरे/हमारे पास उर्वरकों/सूक्ष्म पोषक तत्व वाले उर्वरकों के मिश्रण/कार्बनिक उर्वरकों/जैव उर्वरकों के भौतिक/दानेदार मिश्रण, प्रत्येक की मात्रा तथा प्रत्येक के सामने नोट किए गए विभिन्न पते ;
9. (i) यदि आवेदक उर्वरकों के भौतिक/दानेदार मिश्रणों/सूक्ष्म पोषक तत्व युक्त उर्वरकों/कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरकों के मिश्रण बनाने का कारबार कर रहा है तो प्रहस्तित ऐसे मिश्रणों की अवधि और स्थान जहां उर्वरकों को मिश्रित किया गया था, का सभी विवरण दें ;
- (ii) पिछले कैलेंडर वर्ष के दौरान प्रहस्तित किए गए भौतिक/दानेदार उर्वरक मिश्रण कार्बनिक उर्वरक/जैव-उर्वरक की मात्रा भी बताएं,
- (10) यदि आवेदन नवीनीकरण के लिए है, तो संक्षिप्त में बताएं कि मूल प्रमाणपत्र का इसकी वैधता की अवधि के अंदर ही पालन क्यों नहीं किया जा सका।

#### **धोषणा-**

- (क) मैं निर्धारित रजिस्ट्रीकरण प्रमाणपत्र फीस/नवीनीकरण फीस जमा करा चुका हूँ।
- (ख) मैं/हम धोषणा करता हूँ/करते हैं कि ऊपर दी गई सूचना मेरी/हमारी जानकारी और विश्वास के अनुसार सत्य और सही है, और इसका कोई भी भाग मिथ्या नहीं है।
- (ग) मैंने/हमने उर्वरक (नियंत्रण) आदेश, 1985 के परिशिष्ट के प्ररूप 'च' में दिए गए विनिर्माण प्रमाणपत्र के नियधन और शर्तों को ध्यानपूर्वक पढ़ा है और मैं/हम उनका पालन करने के लिए सहमत हूँ/हैं।
- (घ) मैं/हम धोषणा करता हूँ/करते हैं कि भौतिक/दानेदार मिश्रण/कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक, जिनके लिए उपयोजित है, प्रमाणपत्र विनिर्माण मेरे/हमारे अथवा उस व्यक्ति द्वारा जिनके पास राज्य सरकार द्वारा समय-समय पर विहित की गई योग्यताएं हैं अथवा मेरे/हमारे निदेश, पर्यवेक्षण और नियंत्रण के अधीन किसी अन्य व्यक्ति अथवा सहायक योग्यताएं रखने वाले व्यक्ति के निदेश, पर्यवेक्षण और नियंत्रण के अधीन तैयार किया जाएगा।
- (ङ) मैं/हम धोषणा करता हूँ/करते हैं कि इस ओदेश के अधीन, नियंत्रक द्वारा विनिर्दिष्ट अपेक्षित प्रयोगशाला सुविधा मेरे/हमारे कब्जाधीन है।

प्राप्ति का नाम और पता-

तिथि:

स्थान:

आवेदक के हस्ताक्षर "

17. उक्त आदेश में, प्रारूप 'च' के स्थान पर निम्नलिखित प्ररूप रखा जाएगा, अर्थात् :-

**प्ररूप 'च'**  
**(खण्ड 15(2) तथा 18(2) देखें)**

|                         |                     |
|-------------------------|---------------------|
| पुस्तक सं०.....         | प्रमाणपत्र सं०..... |
| जारी करने की तारीख..... |                     |
| वैधता....., तक          |                     |

**भौतिक/दानेदार मिश्रण/कार्बनिक-उर्वरक/जैव उर्वरक के संबंध में विनिर्माण प्रमाणपत्र**

.....विनिर्माता का नाम को इस प्रमाणपत्र के निबंधन और शर्तों तथा उर्वरक (नियंत्रण) आदेश 1985 के उपबंधों के अधीन निम्न विनिर्दिष्ट भौतिक/दानेदार मिश्रण/कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक के विनिर्माण के लिए प्रमाणपत्र दिया जाता है।

कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक का पूर्ण व्यौरा

उन परिसरों का पूरा पता जहां कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक तैयार किया जाएगा

तारीखः

रजिस्ट्रीकरण प्राधिकारीः

मुहरः

राज्यः

तारीखः

.....तक नवीनीकृत

रजिस्ट्रीकरण प्राधिकारीः

मुहरः

राज्यः

इस प्रमाणपत्र के निबंधन और शर्ते

(1) इस प्रमाणपत्र का धारक उस प्रधान परिसर, जिसमें भौतिक/दानेदार मिश्रण/कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक का कारबार किया जाता है उस भाग में, जो जनता के लिए खुले किसी सहजदृश्य स्थान पर, उसका मूल प्रदर्शित करेगा और इसी रीति से ऐसे प्रमाणपत्र की एक प्रति प्रत्येक अन्य परिसर में भी, जहां वह कारबार चलाया जाता है प्रदर्शित करेगा। प्रमाणपत्र की प्रतियों की अपेक्षित संख्या, उनकी फीस के भुगतान करने पर अभी प्राप्त कर ली जाएंगी।

(2) इस प्रमाणपत्र का धारक उस परिसर में नहीं रखेगा, जहां वह जैव उर्वरकों/कार्बनिक उर्वरक के भौतिक/दानेदार मिश्रण बनाने का कारबार चलाता है, जिसके संबंध में उर्वरक (नियंत्रण) आदेश, 1985 के अधीन रजिस्ट्रीकरण प्रमाणपत्र अभिप्राप्त नहीं किया गया है।

(3) इस प्रमाणपत्र का धारक उर्वरक (नियंत्रण) आदेश, 1985 और उसके अधीन तत्समय प्रवृत्त जारी की गई अधिसूचना आदेश और निदेशन के उपबंधों का अनुपालन करेगा।

(4) प्रमाणपत्र का धारक रजिस्ट्रीकरण प्राधिकारी को प्रमाणपत्र में विनिर्दिष्ट परिसर में या किसी नए परिसर में जिसमें वह भौतिक/दानेदार मिश्रण/कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक बनाने का कारबाह चलाता है कोई परिवर्तन होने पर तत्काल रिपोर्ट करेगा और प्राधिकारी के सामने मूल प्रमाणपत्र और उसकी प्रतियां प्रस्तुत करेगा ताकि उस प्राधिकारी द्वारा आवश्यक संशोधन किए जा सके।

(5) इस प्रमाणपत्र का धारक यह सुनिश्चित करेगा कि भौतिक/दानेदार मिश्रण/कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक, जिनके संबंध में रजिस्ट्रीकरण का प्रमाण पत्र अभिप्राप्त किया गया है, उसके द्वारा अथवा इस प्रकार की योग्यताएं जैसी कि समय-समय पर राज्य सरकार द्वारा विदित की जाएं रखने वाले व्यक्ति द्वारा अथवा धारक के निवेशन, पर्यवेक्षण और नियंत्रण के अधीन अथवा उक्त योग्यताएं रखने वाले व्यक्ति द्वारा तैयार किया जाता है।

(6) प्रमाणपत्र और उसकी कोई प्रतियां, यदि कोई हों, मशीन द्वारा नबर दिया जाएगा और उसे उसके धारक अथवा प्रमाणपत्र की कार्बन प्रति पर उसके अभिकर्ता के हस्ताक्षर पर सुपुर्द किया जाएगा, जो प्रत्येक “रजिस्ट्रीकरण प्राधिकारी” द्वारा “प्रमाणपत्र पुस्तिका” में बांधा हुआ, अविकल रखा जाएगा।

18. उक्त आदेश में प्ररूप के पश्चात निम्नलिखित प्ररूप अंतःस्थापित किया जाएगा, अर्थात्

#### “प्ररूप”

(खंड 28 (ख ख देखें)

नमूने लिए गए कार्बनिक उर्वरक जैव उर्वरकों के ब्यौरे दर्शाने वाला प्ररूप

- (1) व्यौहारी/विनिर्माणकर्ता आयातकर्ता का नाम और पता \_\_\_\_\_
- (1क) \* पजीकरण सख्त्या का प्रमाण पत्र \_\_\_\_\_
- (2) नमूना लेने की तारीख \_\_\_\_\_
- (3) थोलों पर चिन्हों के ब्यौरे देना जहां से नमूने लिए गए हैं \_\_\_\_\_
  
- (i)\* कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक का प्रकार \_\_\_\_\_
- (ii) विनिर्माणकर्ता आयातकर्ता का नाम \_\_\_\_\_
- (iii)\* बैच सं. (यदि लागू हो) और विनिर्माण/आयात की तारीख \_\_\_\_\_
- (v) सघटन \_\_\_\_\_
  
- (4) व्यौहारी/विनिर्माणकर्ता/आयातकर्ता/व्यवस्थापन एजेन्सी पूल द्वारा \_\_\_\_\_  
स्टाक के प्राप्त करने की तारीख \_\_\_\_\_

- (5) \* नमूने की कोड संख्या \_\_\_\_\_
- (6) ढेर के स्टाक की स्थिति \_\_\_\_\_
- (7) कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक की भौतिक स्थिति \_\_\_\_\_
- (8) क्या नमूने खुले थैलों से \*\* अथवा सिले हुए थैलों से \*\* बंद पैकेटों से लिए गए हैं \_\_\_\_\_
- (9) नमूना लेने वाले कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक निरीक्षक का नाम और पता \_\_\_\_\_

\*\* कार्बनिक उर्वरक के लिए

उर्वरक निरीक्षक  
के हस्ताक्षर और धात्विक मुहर

### बौहारी की पावती

प्रमाणित किया जाता है कि कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक का नमूना उर्वरक (नियन्त्रण) आदेश, 1985 में अधिकथित प्रक्रिया के अनुसार मेरे कब्जे वाले स्टाक से लिया गया है और मैंने वैक्स सीलिंग के समय परीक्षण वाले नमूनों पर हस्ताक्षर किए हैं। मैंने भी तैयार तीन परीक्षण वाले नमूनों में से एक नमूना प्राप्त कर लिया है।

उर्वरक निरीक्षक के  
हस्ताक्षर और मुहर

बौहारी/विनिर्माणकर्ता/  
आयातकर्ता/पूल हैडलिंग एजेन्सी  
के हस्ताक्षर, पते सहित"

19. उपर्युक्त आदेश में, प्ररूप ट के पश्चात् निम्नलिखित प्ररूप अंतःस्थापित किया जाएगा,  
अर्थात्:

**"प्ररूप 'ट-1'  
(खंड 30 देखें)**

**विश्लेषण के लिए संलग्न कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक नमूने का ज्ञापन**

सं०

प्रेषक

---



---

सेवा में

प्रभारी,

कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक गुणवत्ता नियंत्रण प्रयोगशाला

नीचे दिये गए विवरण के अनुसार जैव उर्वरक नमूने विश्लेषण के लिए भेजे जाते हैं:-

- (1) \*कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक का नाम \_\_\_\_\_
- (2) नमूना लेने की तारीख \_\_\_\_\_
- (3) कार्बनिक उर्वरक/जैव उर्वरक की भौतिक स्थिति \_\_\_\_\_
- (4) नमूने की कोड संख्या \_\_\_\_\_

**2. विश्लेषण रिपोर्ट कृपया**

---

\_\_\_\_\_ को भेजी जाए

स्थान:

दिनांक:

उर्वरक निरीक्षक के हस्ताक्षर  
और धात्तिक मुहर"

20. उक्त आदेश में, प्ररूप ठ के पश्चात निम्नलिखित प्ररूप अंतः स्थापित किया जाएगा,  
अर्थात्:-

**"प्ररूप 'ठ-1'"  
(खण्ड 30 देखें)**

**कार्बनिक उर्वरक नमूने की विश्लेषण रिपोर्ट**

सं० \_\_\_\_\_

सरकार

(प्रयोगशाला का नाम)

तारीख \_\_\_\_\_

सेवा में

उर्वरक निरीक्षक

आपके संदर्भ सं० \_\_\_\_\_

तारीख \_\_\_\_\_

द्वारा अग्रेषित कार्बनिक उर्वरक नमूने की विश्लेषण रिपोर्ट विवरणानुसार नीचे दी गई है:-

- (1) \*कार्बनिक उर्वरक का नाम \_\_\_\_\_
- (2) नमूना लेने की तारीख \_\_\_\_\_
- (3) नमूने की कोड सं० जैसा निरीक्षक द्वारा उल्लेख किया गया
- (4) प्रयोगशाला में नमूने की प्राप्ति की तारीख \_\_\_\_\_
- (5) प्रयोगशाला नमूना सं० \_\_\_\_\_
- (6) नमूने के विश्लेषण की तारीख \_\_\_\_\_
- (7) कार्बनिक उर्वरक का विश्लेषण (नया भार आधार पर)

| क्र.सं. | एफसीओ के अनुसार<br>विनिर्देशन | विश्लेषण के अनुसार<br>संघटन | विचरण | अनुज्ञेय सहन सीमा |
|---------|-------------------------------|-----------------------------|-------|-------------------|
| 1       | 2                             | 3                           | 4     | 5                 |
| (क)     | <u>भौतिक विशेषताएं</u>        |                             |       |                   |
| (i)     | नमी की मात्रा                 | .....                       |       |                   |
| (ii)    | बल्क संधनता                   | .....                       |       |                   |
| (iii)   | कण का आकार                    | .....                       |       |                   |
| (ख)     | <u>रासायनिक विशेषताएं</u>     |                             |       |                   |
| (i)     | कुल कार्बनिक कार्बन           | .....                       |       |                   |
| (ii)    | कुल नाइट्रोजन                 | .....                       |       |                   |
| (iii)   | सीःएन                         | .....                       |       |                   |
| (iv)    | फास्फोरस                      | .....                       |       |                   |
| (v)     | पोटेशियम                      | .....                       |       |                   |
| (vi)    | फीएच                          | .....                       |       |                   |
| (vii)   | चालकता                        | .....                       |       |                   |
| (ग)     | <u>भारी मेटल</u>              |                             |       |                   |
| (i)     | केडमियम                       | .....                       |       |                   |
| (ii)    | क्रोमियम                      | .....                       |       |                   |
| (iii)   | कॉपर                          | .....                       |       |                   |
| (iv)    | मर्करी                        | .....                       |       |                   |
| (v)     | निकेल                         | .....                       |       |                   |
| (vi)    | लेड                           | .....                       |       |                   |
| (vii)   | जिन्क                         | .....                       |       |                   |

टिप्पणियां : नमूना विनिर्देशन अनुसार है/नहीं है और  
.....  
.....  
..... में असफल  
..... होता है।

## प्रभारी के हस्ताक्षर (परीक्षण प्रयोगशाला)

प्रतिलिपि :

कृषि निदेशक

प्ररूप 'ठ - 2'  
(खण्ड 30 देखें)

जैव उर्वरक नमूने की विश्लेषण रिपोर्ट

सं० .....

.....

..... सरकार

(प्रयोगशाला का नाम)

तारीख .....

सेवा में .....

उर्वरक निरीक्षक

.....

.....

आपके संदर्भ सं० ..... तारीख ..... द्वारा अधेष्ठित जैव कार्बनिक उर्वरक  
नमूने की विश्लेषण रिपोर्ट विवरणानुसार नीचे दी गई है :

- |  |       |
|--|-------|
| (1) जैव उर्वरक का नाम                                | ..... |
| (2) नमूना लेने की तिथि                               | ..... |
| (3) निरीक्षक द्वारा यथा उपदर्शित नमूने<br>की कोड सं० | ..... |
| (4) प्रयोगशाला में नमूना प्राप्ति की तारीख           | ..... |
| (5) प्रयोगशाला नमूना सं०                             | ..... |
| (6) नमूने के विश्लेषण की तारीख                       | ..... |
| (7) जैव उर्वरक का विश्लेषण<br>(नया भार आधार पर)      | ..... |

| क्र.सं. | एफसीओ के अनुसार विनिर्देशन<br>(राइजोबियम, एजोटोबेक्टर,<br>एजोस्पाइरिलम, पीएसएम) | विश्लेषण के अनुसार<br>संघटन (राइजोबियम,<br>एजोटोबेक्टर,<br>एजोस्पाइरिलम,<br>पीएसएम) | बिचरण | अनुज्ञेय सहन सीमा |
|---------|---|---|-------|-------------------|
|---------|---|---|-------|-------------------|

1 2

3

4

5

- (क) भौतिक विशेषताएं  
(i) नमी की मात्रा

- (ii) कण का आकार
- (ख) रासायनिक विशेषताएं
- (i) पीएच
- (ग) माइक्रोबियल विशेषताएं
- (i) व्यवहार्य सैलकाउंट
- (ii) संदूषण स्तर
- (घ) कार्यक्षमता विशेषताएं
  - \*(i) नोडुलेशन परीक्षण
  - \*\*(ii) उपभोग किए गए सुक्रोस का नाइट्रोजन फिक्स्ड (मिंग्रा०)/ग्रा०
  - \*\*\*(iii) सेमी सोलिड नाइट्रोजन फ्री ब्रोमोथिमॉल नीले मीडिया में सफेद पेलिकल का निर्माण
- + (iv) (क) सोल्युबिलाइजेशन जोन (मिमि)
- (ख) पी- फास्फोरस (%)
- स्पेक्ट्रोफोटोमीटर

\* राइजोबियम, \*\* एजोटोबेक्टर, \*\*\* एजोस्पाइरिलम, + पीएसएम

टिप्पणियां : नमूना विनिर्देशन अनुसार है/नहीं है और ..... में असफल होता है।

प्रतिलिपि :  
कृषि निदेशक

प्रभारी के हस्ताक्षर  
(परीक्षण प्रयोगशाला)  
[सं. 9-23/2005-ओ.फ.]  
सतीश चन्द्र, संयुक्त सचिव

टिप्पणी : उर्वरक (नियंत्रण) आदेश, 1985 भारत के राजपत्र में तारीख 25 सितम्बर, 1985 के संख्या सा.का.नि. 758(अ) के अनुसार प्रकाशित किया गया था और बाद में निम्न संख्या के अनुसार इसमें संशोधन किया गया :—

1. सा.का.नि. 201(अ), तारीख 14 फरवरी, 1986
2. सा.का.नि. 508(अ), तारीख 19 मार्च, 1986
3. सा.का.नि. 1160(अ), तारीख 21 अक्टूबर, 1986
4. का.आ. 822(अ), तारीख 14 सितम्बर, 1987
5. का.आ. 1079(अ), तारीख 11 दिसम्बर, 1987
6. का.आ. 252(अ), तारीख 11 मार्च, 1988
7. का.आ. 724(अ), तारीख 28 जुलाई, 1988
8. का.आ. 725(अ), तारीख 28 जुलाई, 1988
9. का.आ. 940(अ), तारीख 11 अक्टूबर, 1988
10. का.आ. 498(अ), तारीख 29 जून, 1989

19. का.आ. 444(अ), तारीख 2 जुलाई, 1991
20. का.आ. 530(अ), तारीख 16 अगस्त, 1991
21. का.आ. 795(अ), तारीख 22 नवम्बर, 1991
22. का.आ. 377(अ), तारीख 29 मई, 1992
23. का.आ. 534(अ), तारीख 20 जुलाई, 1992
24. का.आ. 826(अ), तारीख 9 नवम्बर, 1992
25. का.आ. 354(अ), तारीख 3 जून, 1993
26. का.आ. 397(अ), तारीख 18 जून, 1993
27. का.आ. 942(अ), तारीख 10 दिसम्बर, 1993
28. का.आ. 163(अ), तारीख 14 फरवरी, 1994
29. का.आ. 340(अ), तारीख 17 अप्रैल, 1995
30. का.आ. 459(अ), तारीख 22 मई, 1995
31. का.आ. 835(अ), तारीख 12 अक्टूबर, 1995
32. का.आ. 575(अ), तारीख 20 अगस्त, 1996

- |  |   |
|--|---|
| 11. का.आ. 581(अ), तारीख 27 जुलाई, 1989   | 33. का.आ. 57(अ), तारीख 22 जनवरी, 1997   |
| 12. का.आ. 673(अ), तारीख 25 अगस्त, 1989   | 34. का.आ. 329(अ), तारीख 12 मई, 1999     |
| 13. का.आ. 738(अ), तारीख 15 सितम्बर, 1989 | 35. का.आ. 1068(अ), तारीख 4 नवम्बर, 1999 |
| 14. का.आ. 140(अ), तारीख 12 फरवरी, 1990   | 36. का.आ. 49(अ), तारीख 16 जनवरी, 2003   |
| 15. का.आ. 271(अ), तारीख 29 मार्च, 1990   | 37. का.आ. 373(अ), तारीख 1 अप्रैल, 2003  |
| 16. का.आ. 403(अ), तारीख 23 मई, 1990      | 38. का.आ. 413(अ), तारीख 7 अप्रैल, 2003  |
| 17. का.आ. 675(अ), तारीख 31 अगस्त, 1990   | 39. का.आ. 540(अ), तारीख 4 मई, 2003      |
| 18. का.आ. 261(अ), तारीख 16 अप्रैल, 1991  | 40. का.आ. 342(अ), तारीख 18 मार्च, 2005  |

**MINISTRY OF AGRICULTURE**  
**(Department of Agriculture and Cooperation)**  
**ORDER**

New Delhi, the 24th March, 2006

**S.O. 391(E).—In exercise of the powers conferred by section 3 of the Essential Commodities Act, 1955 (10 of 1995), the Central Government hereby makes the following Order further to amend the Fertilizer (Control) Order, 1985, namely :-**

1. (1) This Order may be called the Fertilizer (Control) Amendment Order, 2006.
- (2) It shall come into force on the date of its publication in the Official Gazette.
2. In the Fertilizer (Control) Order, 1985 (herein after referred to as the said Order), in clause 2 -

(A) after sub-clause (a), the following sub-clause shall be inserted, namely :-

"(aa) Biofertilizer means the product containing carrier based (solid or liquid) living microorganisms which are agriculturally useful in terms of nitrogen fixation, phosphorus solubilization or nutrient mobilization, to increase the productivity of the soil and/or crop;"

(B) in sub-clause (h), for the words "and special mixture of fertilizers", the words "special mixture of fertilizer, Bio-fertilizers Specified in Schedule III and Organic fertilizers specified in Schedule IV" shall be substituted;

(C) after sub-clause (o), the following sub-clause shall be inserted, namely :-

"(oo) Organic fertilizer means substances made up of one or more unprocessed material(s) of a biological nature (plant/animal) and may include unprocessed mineral materials that have been altered through microbiological decomposition process";

(D) in sub-clause (q) after the item iii, the following shall be inserted, namely:-

(iv) in relation to a Biofertilizer included in column 1 of Part A of Schedule III,

the standard set out in the corresponding entry in column 2, subject to the limits of permissible variation as specified in part B of that Schedule;" ;

(v) in relation to a Organic Fertilizer included in column 1 of part A of Schedule IV , the standard set out in the corresponding entry in column 2, subject to the limits of permissible variation as specified in Part B of that Schedule."

3. In the said Order, for chapter heading "V. MANUFACTURE OF MIXTURE OF FERTILIZERS", the chapter heading "V. MANUFACTURE OF MIXTURE OF FERTILIZERS, ORGANIC FERTILIZERS AND BIO-FERTILIZERS" shall be substituted.

4. In clause 12 of the said Order, for the words "or special mixture of fertilizer", the words "special mixture of fertilizer, Bio-fertilizer or Organic fertilizer" shall be substituted.

5. In clause 13 of the said Order, for sub-clause (1), the following shall be substituted, namely:-

"(1) Subject to the other provisions of this Order,-

(a) no person shall manufacture any mixture of fertilizers whether of solid or liquid fertilizers specified in Part A of Schedule-I of the Order unless such mixture conforms to the standards set out in the notification to be issued by the state Government in the Official Gazette;

(b) no person shall manufacture any Bio-fertilizer unless such Bio-fertilizer conforms to the standards set out in the part A of Schedule-II;

(c) no person shall manufacture any Organic fertilizer unless such organic fertilizer conforms to the standards set out in the part A of Schedule -IV."

6. In clause 14, after sub-clause (2), the following sub-clause shall be inserted, namely :-

"(3) Every person desiring to obtain a Certificate of Manufacture for preparation of Organic fertilizer or Bio-fertilizer shall make an application in Form D, in duplicate, together with a fee prescribed therefor under clause 36, to Registering authority".

7. In clause 15 of the said Order ,-

(i) for the heading the following shall be substituted, namely:-

"Grant or refusal of Certificate of manufacture for preparation of mixture of fertilizers, Bio-fertilizers or Organic fertilizers" shall be substituted;

(ii) in sub-clause (1), after the words "mixture of fertilizer" the words "Biofertilizer, Organic fertilizer" shall be inserted;

- (iii) in sub-clause (2), after the words "mixture of fertilizer" the words, "Bio-fertilizer or Organic fertilizers" shall be inserted.
8. In clause 17 of the said Order,-
- in the heading, after the words "mixture of fertilizer" the words "Bio-fertilizer or Organic fertilizers" shall be inserted,-
  - after the words "mixture of fertilizers" the words "Bio-fertilizer or Organic fertilizers" shall be inserted.
9. In clause 18 of the said Order ,-
- in the heading, after the words "preparation of mixture of fertilizers", the words "Bio-fertilizers or Organic fertilizer" shall be inserted;
  - in sub-clause (1), after the words "mixture of fertilizer" the words "Biofertilizer or Organic fertilizer" shall be inserted.
10. In clause 21 of the said Order ,-
- for the word "fertilizers", the words "fertilizers, Bio-fertilizers or Organic fertilizers" shall be inserted;
  - after sub-paragraph (a), the following shall be inserted, namely:-  
" (aa) Every container in which any Bio-fertilizer or Organic fertilizer is packed shall conspicuously be superscribed with the words BIO-FERTILIZERS/ORGANIC FERTILIZERS and shall bear only such particulars and unless otherwise required under any law nothing else, as may from time to time, be specified by the Controller in this behalf".
11. After clause 27 A of the said Order, the following clause shall be inserted, namely:-
- "27 B Qualifications for appointment of Inspectors for Biofertilizer and Organic Fertilizer no person shall be eligible for appointment as inspector of Bio-fertilizer and Organic Fertilizer under this Order unless he may possess the following qualifications, namely:-
- Graduate in agriculture or science with chemistry/microbiology as one of the subjects; and
  - training or experience in the field of quality control of Bio-fertilizers/ Organic fertilizers.
12. In clause 28 of the said Order, in sub-clause 1, after entry (b) the following entries shall be inserted, namely :-

“(ba) draw samples of any Bio-fertilizers in accordance with the procedure of withdrawal of samples laid down in Schedule III.”;

“(bb) draw samples of any Organic fertilizers in accordance with procedure of withdrawal of samples laid down in Schedule IV.”

13. In clause 29 of the said Order, after sub-clause (1), the following sub-clauses shall be inserted, namely,-

“(1A) Bio-fertilizer samples drawn by an inspector shall be analysed in accordance with the instructions laid down in Schedule III in the National Center for Organic Farming, Ghaziabad or Regional Centers of Organic Farming at Bangalore, Bhubaneswar, Hissar, Imphal, Jabalpur and Nagpur or any other laboratory notified by Central or State Government.;

(1B) Organic fertilizer samples drawn by an inspector shall be analyzed in accordance with the instructions laid down in Schedule IV in the National Center for Organic Farming, Ghaziabad or Regional Centers of Organic Farming at Bangalore, Bhubaneswar, Hissar, Imphal, Jabalpur and Nagpur or any other laboratory notified by Central or State Government.”

14. In clause 30 of the said Order,-

(a) in sub-clause (1), after the word and letter “Form K”, the following shall be inserted, namely, “and in case of Organic fertilizers and Bio-fertilizers in form K-1”;

(b) in sub-clause (2), after the word and letter “Form L” the following shall be inserted, namely,-

“and in case of Organic fertilizers and Bio-fertilizer in Form L 1.”

15. in the said Order, after Schedule II, the following Schedules shall be inserted, namely,

**Schedule III**  
**[see clause 2(h) and (q)]**  
**PART – A**

**SPECIFICATION OF BIOFERTILISERS**

**I. Rhizobium**

|      |                   |   |
|------|-------------------|---|
| (i)  | Base              | = Carrier based* or liquid based  |
| (ii) | Viable cell count | = CFU minimum $10^7$ cell/g of carrier material or $10^7$ cell/ml of liquid material. |

|       |  |   |
|-------|--|---|
| (iii) | Contamination level  | = No contamination at $10^5$ dilution                                       |
| (iv)  | pH   | = 6.5 – 7.5   |
| (v)   | Particle size in case of carrier based material              | = All material shall pass through 0.15-0.212 mm IS Sieve                    |
| (vi)  | Moisture percent by weight, maximum in case of carrier based | = 30-40%  |
| (vii) | Efficiency Character   | = Should show effective nodulation on all the species listed on the packet. |

**\*Type of Carrier:**

The carrier material such as peat, lignite, peat soil, humus, wood charcoal or similar material favoring growth of the organism.

**2. Azotobacter**

|       |   |   |
|-------|---|---|
| (i)   | Base  | = Carrier based* or liquid based  |
| (ii)  | Viable cell count                               | = CFU minimum $10^7$ cell/g of carrier material or $10^7$ cell/ml of liquid material.         |
| (iii) | Contamination level                             | = No contamination at $10^5$ dilution   |
| (iv)  | pH  | = 6.5 – 7.5   |
| (v)   | Particle size in case of carrier based material | = All material shall pass through 0.15-0.212 mm IS Sieve                                      |
| (vi)  | Moisture percent by weight, maximum             | = 30-40%  |
| (vii) | Efficiency Character                            | = The strain should be capable of fixing at least 10 mg of nitrogen per g of sucrose consumed |

**\*Type of Carrier:**

The carrier material such as peat, lignite, peat soil, humus, wood charcoal or similar material favoring growth of the organism.

**3. Azospirillum**

|       |  |   |
|-------|--|---|
| (i)   | Base   | = Carrier based* or liquid based  |
| (ii)  | Viable cell count  | = CFU minimum $10^7$ cell/g of carrier material or $10^7$ cell/ml of liquid material. |
| (iii) | Contamination level  | = No contamination at $10^5$ dilution   |
| (iv)  | pH   | = 6.5 – 7.5   |
| (v)   | Particle size in case of carrier based material              | = All material shall pass through 0.15-0.212 mm IS Sieve                              |
| (vi)  | Moisture percent by weight, maximum in case of carrier based | = 30-40%  |
| (vii) | Efficiency Character   | = Formation of white pellicle in semisolid Nitrogen free bromothymol blue media.      |

**\*Type of Carrier:**

The carrier material such as peat, lignite, peat soil, humus, wood charcoal or similar material favoring growth of the organism.

#### **4. Phosphate Solubilising Bacteria**

|       |  |   |
|-------|--|---|
| (i)   | Base   | = Carrier based* or liquid based  |
| (ii)  | Viable cell count  | = CFU minimum $10^7$ cell/g of carrier material or $10^7$ cell/ml of liquid material.   |
| (iii) | Contamination level  | = No contamination at $10^5$ dilution   |
| (iv)  | pH   | = 6.5 – 7.5   |
| (v)   | Particle size in case of carrier based material              | = All material shall pass through 0.15-0.212 mm IS Sieve  |
| (vi)  | Moisture percent by weight, maximum in case of carrier based | = 30-40%  |
| (vii) | Efficiency Character   | = The strain should have phosphate solubilizing capacity in the range of minimum 30%, when tested spectrophotometrically. In terms of zone formation, minimum 5 mm solubilization zone in prescribed media having at least 3 mm thickness |

**\*Type of Carrier:**

**The carrier material such as peat, lignite, peat soil, humus, wood charcoal or similar material favoring growth of the organism.**

#### **Part – B**

#### **TOLERANCE LIMIT OF BIOFERTILISER**

$5 \times 10^5$  CFU/g of carrier or per ml of liquid material.

#### **Part – C**

#### **PROCEDURE FOR DRAWL OF SAMPLE OF BIO-FERTILISER**

##### **PROCEDURE FOR SAMPLING OF BIO-FERTILISERS**

###### **1. General Requirements**

1.0. In drawing , preparing and handling the samples, the following precautions and directions shall be observed.

1.1 . Sampling shall be carried out by a trained and experienced person as it is essential that the sample should be representative of the lot to be examined.

1.2. Since the samples are also required for micro-biological analysis, utmost care is necessary to avoid extraneous contamination while drawing and handling the samples and to preserve them in their original conditions till they are ready for examination in the laboratory .

1.2.1. No preservatives or bactericidal / fungicidal agent shall be added to samples required for microbiological analysis.

1.3. Samples in their original un opened packets should be drawn and sent to the laboratory to prevent possible contamination of the samples during handling and help in revealing the true condition of the material .

1.4. Intact packets shall be drawn from a protected place not exposed to dampness, air, light , dust or soot and transferred to clean containers.

## **2. Sampling Equipment**

2.1 . A suitable scoop made of stainless steel may be used for drawing samples.

2.2. The sampling equipment shall be perfectly clean and sterile. It shall be properly sterilized by heating in a hot air oven at  $160^0\text{C}$  for not less than 2 h or by autoclaving for not less than 20 min at  $120^0\text{C}$  and held in suitable containers to prevent re-contamination.

## **3. Scale of sampling**

### **3.1 . Lot**

All units (containers in a single consignment of type of material belonging to the same batch of manufacture) shall constitute a lot. If a consignment consists of different batches of the manufacture the containers of the same batch shall be separated and shall constitute a separate lot.

### **3.2 . Batch**

An inoculant prepared from a batch fermentor or a group of flasks (containers) constitute a batch.

3.3 For ascertaining conformity of the material to the requirements of the specification, samples shall be tested from each lot separately.

3.4 . The number of packets to be selected from a lot shall depend on the size of the lot and these packets shall be selected at random and in order to ensure the randomness of selection .

## **4. Drawal of samples:**

4. 1. Three samples should be drawn separately from each lot.

## **Part – D**

### **METHODS OF ANALYSIS OF BIOFERTILISER**

#### **1. A. METHOD OF ANALYSIS OF RHIZOBIUM BIO- FERTILISERS**

##### **1. APPARATUS**

1.1 Pipettes Graduated 1 ml and 10 ml

**1.2 . Dilution Bottles or Flasks**

1.3 . Petri Dishes Clear, Uniform , flat – bottomed.

**1.4 Hot – Air Oven**

Capable of giving uniform and adequate temperature, equipped with a thermometer , calibrated to read up to  $250^{\circ}$  C and with vents suitably located to assure prompt and uniform heating .

**1.5. Autoclave**

**1.6. Incubator**

**1.7. Hand Tally or Mechanical counting Device**

**1.8 pH meter**

**2. REAGENTS**

**2.1. Congo Red – one percent aqueous solution**

**2.2. Medium**

Use a plating medium of the following composition :

|   |         |
|---|---------|
| Agar  | 20 g    |
| Yeast Extract                               | 1 g     |
| Mannitol                                    | 10 g    |
| Potassium hydrogen phosphate ( $K_2HPO_4$ ) | 0.5 g   |
| Magnesium sulphate ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) | 0.2 g   |
| Sodium Chloride (NaCl)                      | 0.1 g   |
| Congo red                                   | 2.5 ml  |
| Distilled water                             | 1000 ml |
| pH  | 7.0     |

**2.3. Sterilizing and preparation procedure for plates :**

2.3.1. Sterilize the sampling and plating equipment with dry heat in a hot air oven at not less than  $160^{\circ}$  C for not less than 2 hours .

2.3.2. Sterilize the media by autoclaving at  $120^{\circ}$  C for 20 min. To permit passage of steam into and from closed containers when autoclaved , keep stoppers slightly loosened or plugged with cotton. Air from with in the chamber of the sterilizer should be ejected allowing steam pressure to rise.

**Preparation Of Plating Medium And Pouring**

2.3.3. Prepare growth medium in accordance with the composition of the specific biofertiliser

2.3.4. Melt the required amount of medium in boiling water or by exposure to flowing steam in partially closed container but avoid prolonged exposure to unnecessarily high temperature during and after melting. Melt enough medium which will be used with in 3 h. Re-sterilisation of the medium may cause partial precipitation of ingredients.

2.3.5. When holding time is less than 30 min, promptly cool the molten medium to about  $45^{\circ}\text{C}$ , and store until used, in a water bath or incubator at  $43$  to  $45^{\circ}\text{C}$ . Introduce 12 to 15 ml of liquefied medium or appropriate quantity depending on size of the petridish at  $42$  to  $44^{\circ}\text{C}$  into each plate. Gently lift the cover of the dish just enough to pour in the medium. Sterilise the lips of the medium containers by exposure to flame.

- immediately before pouring.
- Periodically during pouring , and
- When pouring is complete for each batch of plates, if portions of molten medium remain in containers and are to be used without subsequent sterilization for pouring additional plates. As each plate is poured thoroughly mix the medium with test portions in the Petri dish .

2.3.6. By rotating and tilting the dish and without splashing the medium over edge, spread the medium evenly over the bottom of the plate. Provide conditions so that the medium solidifies with reasonable promptness (5-10 min) before removing the plates from level surface.

### 3. PREPARATION OF SERIAL DILUTIONS FOR PLATE COUNTS

3.1. Dispense 30 g of Inoculant to 270 ml of sterile distilled demineralized water and shake for 10 min on a reciprocal shaker or homogeniser. Make serial dilutions up to  $10^{10}$  Take 0.1 ml or suitable aliquots of  $10^6$  to  $10^9$  dilutions using sterile pipettes and deliver to Petri dishes containing set medium as given in 2.1 and spread it uniformly with a spreader. Invert the plates and promptly place them in the incubator.

### 4. INCUBATION OF PLATES

4.1 . Label the plates and incubate at  $28 +/- 2^{\circ}\text{C}$  for 3 to 5 days for fast growing Rhizobia and 5 to 10 days for slow –growing ones

#### 4.2 Colony Counting aids

Count the colonies with the aid of magnifying lens under uniform and properly controlled , artificial illumination . Use a colony counter , equipped with a guide plate and rules in centimeter square. Record the total number of colonies with the hand tally. Avoid mistaking particles of undissolved medium or precipitated matter. in plates for pin-point colonies. To distinguish colonies form dirt, specks and other foreign matter, examine doubtful objects carefully.

4.3. Count all plates but consider for the purpose of calculation plates showing more than 30 and less than 300 colonies per plate. Disregard colonies which absorb congo red and stand out as reddish colonies. Rhizobium stands out as white, translucent , glistening and elevated colonies. Count such colony numbers and calculate figures in terms of per litre , of carrier. Also check for freedom from contamination at  $10^5$  dilution.

### 5. TEST FOR NODULATION

#### 5.1 POT CULTURE TEST

##### Plant Nutrient Solution

|     | Composition   | Concentration | g/l    |
|-----|---|---------------|--------|
| (a) | Potassium chloride  | 0.001 M       | 0.0745 |
| (b) | Potassium hydrogen Phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) | 0.001 M       | 0.175  |

|     |   |              |       |
|-----|---|--------------|-------|
| (c) | Calcium sulphate (CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)   | 0.002M       | 0.344 |
| (d) | Magnesium sulphate (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)   | 0.001 M      | 0.246 |
| (e) | Trace elements solution:  |              |       |
| (1) | Copper sulphate (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)  | 0.01 mg/kg   | 0.78  |
| (2) | Zinc sulphate (ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)  | 0.25 mg/kg   | 2.22  |
| (3) | Manganese sulphate (MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O)   | 0.25 mg/kg   | 2.03  |
| (4) | Ammonium molybdate [(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O] | 0.0025 mg/kg | 0.01  |
| (5) | Boric acid (H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> )  | 0.125 mg/kg  | 1.43  |

Prepare the solution No. (e) consisting of trace elements in one litre of stock solution and add final nutrient solution at the rate of 0.5 ml per litre.

|     |                  |          |
|-----|------------------|----------|
| (f) | Iron solution:   | g/100 ml |
| (1) | ferrous sulphate | 5        |
| (2) | Citric acid      | 5        |

Prepare the solution No. (f) as 100 ml of stock solution and add final nutrient solution at the rate of 0.5 ml per litre.

## PREPARATION

Prepare the nutrient solution by weighing out substances (a), (b) and (d) and dissolving them in a litre of water. To this solution add 0.5 ml of trace elements solution and 0.5 ml of iron solution. Grind in a mortar 0.344 g of calcium sulphate (c) to a fine consistency and add to the final nutrient solution. Autoclave the nutrient solution thus prepared at 120°C for 20 min.

## NOTES

1. The nutrient solution may be prepared in the tap water provided the water is soft.
2. The nutrient solution should be shaken well to disperse calcium sulphate before dispensing.
3. If the solution is made up with distilled water, the pH is about 7.2 before autoclaving and falls to 5.5 on autoclaving and rises slowly on standing to about 5.8. However, there is no need to adjust pH. For most tropical legumes, pH of about 6.0 is adequate.

## 5.3 PROCEDURE

5.3.1. Immerse the seeds in 95 percent alcohol and follow by surface-sterilization in freshly prepared chlorine water (for 15 to 20 min) or 0.1 percent mercuric chloride solution 3 min in a suitable container such as a screw-capped bottle or a test-tube with a rubber hung. In case of seeds with tough seed coat, concentrated sulphuric acid may be used as a surface sterilant for 20 to 30 min. It is recommended that the seeds should be placed overnight in a desiccator containing calcium chloride before surface sterilization with sulphuric acid. Pour out the sterilant and wash the seeds in several changes of sterile water and wash the seeds in several changes of sterile water (at least ten times) to get rid of the sterilant. Fill earthenware or glazed pots with soil (2 parts soil and 1 part washed coarse sand) (pH 6 to 7) and autoclave for 2 h at 120°C. After two days incubation at room temperature, repeat autoclaving to ensure complete sterility of soil. Inoculate surface-sterilized seeds with a water slurry of the inoculant taken from a culture packet (15 to 100 g seeds per gram of inoculant depending on the size of the seed) and sow the seeds. Keep a set of pots with uninoculated seeds as control and also a set of

pots with ammonium nitrate at the rate of 100 kg N/ha as control aid incubate them in a pot-culture house during appropriate seasons for appropriate plants, taking care to separate the inoculated pots from the control pots. If growth rooms or cabinets having facilities to adjust temperature and light are available, the pots may be incubated in such controlled environmental conditions. Sterilize the nutrient solution at 120°C for 20 min and irrigate each pot once to the moisture holding capacity of soil. Subsequently, water the seedling periodically with sterilized water preferably through a plastic tube, taking care to prevent splashing of water from inoculated pots to uninoculated ones. Maintain required number of replicated pots (4 to 6) for each botanical species for statistical analysis.

5.3.2. After two to three weeks of growth, thin down the number of plants in each pot to four uniform plants. At the end of 6 to 8 weeks, take one set of pots from both the control and inoculated series and, separate the plants carefully from the soil under slow-running water. Obtain data on the number, colour (effective nodules are pink or red) and mass of nodules. At the end of 6 to 8 weeks, harvest the shoot system, dry at 60°C for 48 h and determine dry mass. For the above purpose, maintain adequate replications of pots (4 to 16).

5.3.3. Recorded the nodulation data regarding formation of pink colour of nodules as revealed visually when nodules are cut open by a razor blade. After computing the data, based on the dry mass of plants and nodulation data decide the effectiveness of cultures. If good effective pink modulation is obtained in inoculated plants together with local absence or sometimes presence of stray nodules in controls and if there is a 50 percent increase in the dry mass of plants over the uninoculated control without nitrate, it may be concluded that the culture is of the required quality.

## 1. B. METHOD OF ANALYSIS OF AZOTOBACTER BIO – FERTILISER

### 1. APPARATUS – same as of *Rhizobium*

### 2. REAGENTS:

#### 2.1 . Medium

Use a plating medium of the following composition

|   |            |
|---|------------|
| Agar  | 20 g       |
| Sucrose ( $C_{12} H_{22} O_{11}$ )          | 20.0 g     |
| Ferric sulphate $Fe_2 (SO_4)_3$             | 0.1 g      |
| Dibasic potassium phosphate ( $K_2HPO_4$ )  | 1.0 g      |
| Magnesium sulphate ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) | 0.5 g      |
| Sodium Chloride ( $NaCl$ )                  | 0.5 g      |
| Calcium carbonate ( $CaCO_3$ )              | 2.0 g      |
| Sodium Molybdate ( $Na_2 MoO_4$ )           | 0.005 gms  |
| Distilled water                             | 1000 ml    |
| pH  | 6.8 to 7.2 |

#### 2.2. Sterilization & preparation procedure for plates:

same as for *Rhizobium*

## PREPARATION OF PLATING MEDIUM AND POURING

### 3. PREPARATION OF SERIAL DILUTIONS FOR PLATE COUNTS:

Dispense 30 g of Inoculant to 270 ml of sterile distilled water and shake for 10 min on a reciprocal shaker. Make serials dilutions up to  $10^{10}$ . Take 0.1 ml or suitable aliquots of  $10^6$  to  $10^9$  dilutions using sterile pipettes and deliver to Petri dishes containing set medium as given in 2.1 and spread it uniformly. Invert the plates and promptly place them in the incubator.

### 4. Incubation of plates:- Same as Rhizobium

4.1. Label the plates and incubate at  $28 \pm 3^\circ\text{C}$  for 4 to 6 days.

4.2. Colony counting aids: Same as Rhizobium

Azotobacter chroococcum colonies are gummy, raised with or without striations, viscous and often sticky. The pigmentation varies from very light brown to black. Count the colony number and observe the cyst formation as given below and calculate number per gram of the carrier material.

Grow the vegetative cells at  $30^\circ\text{C}$  on Burks agar medium comprising sucrose 20 g, dipotassium hydrogen phosphate 0.64 g, dihydrogen potassium phosphate 0.20 g; sodium chloride 0.20 g; calcium sulphate 0.05 g, sodium molybdate 0.001 g; ferric sulphate 0.003 g, agar 20 g and distilled water 1.000 ml. Look for vegetative cells after 18 to 24 h either by simple staining method or through a phase contrast microscope.

Grow the cyst cells on Burks agar medium as given above with 0.3 percent n-butanol in place of the carbon source. Look for cyst formation after 4 to 5 days in cubation.

## 5. TEST FOR NITROGEN FIXATION IN PURE CULTURE

### 5.1. PURE CULTURE MEDIUM

5.1.1. Prepare medium as given for Azotobacter (2.1 under 1 B), excluding agar.

### 5.2. PROCEDURE

Select from each *Azotobacter* colony, of the type that has been counted as *Azotobacter chroococcum* in. One colony and plate on the medium given in. Use this pure culture for inoculating the broth for nitrogen fixation. For this purpose, take 50-ml aliquots of broth in 250-ml conical flasks for inoculation. After 12 days growth at  $28^\circ\text{C}$ , test the contents of the flasks for purity by streaking on fresh medium and concentrating over a water-bath ( $50$  to  $60^\circ\text{C}$ ) to dryness. Wash the dried culture and take it as a sample. The contents of the flasks in inoculated control series should be processed in a similar manner.

### 5.3. Determination by Kjeldahl Method

- (i) Reagents
- (ii) Sulphuric acid – 93 – 98 percent, N-free
- (iii) Digestion mixture – Mix copper sulphate and potassium sulphate in the ratio 1 : 10 and grind them to a fine powder.
- (iv) Sodium hydroxide pellets or solution, N-free – For solution, dissolve about 450 g of sodium hydroxide in water, cool, and dilute to 1 litre (sp gr of the solution should be at least 1.36)
- (v) Zinc granules – reagent grade.
- (vi) Indicators:
  - a) Methyl red indicator - Dissolve 1 g of methyl red in 200 ml of ethanol.
  - b) Mixed indicator - Prepare mixed indicator by dissolving 0.8 of methyl red and 0.2 g of methyl blue in 500 ml of ethanol.
- (vii) Hydrochloric or sulphuric acid - standard solution 0.5 or 0.1 N when amount of nitrogen is small.
- (viii) Sodium hydroxide standard solution – 0.1 N (or other specified concentration).

Note – Ratio of salt to acid (m/v) should be about 1 : 1 at the end of the digestion for proper temperature control. Digestion may be incomplete at a lower ratio, and nitrogen may be lost at higher ratio. Each gram of fat consumes 10 ml of sulphuric acid and each gram of carbohydrate 4.0 ml of sulphuric acid during digestion.

#### 5.4. Apparatus

- (i) For digestion - Use Kjeldahl's flasks of hard, moderately thick, well-annealed glass with total capacity approximately 500 to 800 ml. conduct digestion over heating device adjusted to bring 250 ml of water at 25°C to rolling boil in about 5 minutes. To test the heaters, preheat for 10 minutes in the case of gas burners and for 30 minutes in the case of electric heaters. Add 3 to 4 boiling chips to prevent superheating.
- (ii) For distillation - Use 500- to 800-ml Kjeldahl's flask fitted with rubber stopper through which passes the lower end of an efficient scrubber bulb or trap to prevent mechanical carry-over of sodium hydroxide during distillation. Connect the upper end of the bulb tube to a condenser by a rubber tubing. Trap the outlet of the condenser in such a way as to ensure absorption of ammonia distilled over with the receiver.

## (a) Procedure:-

Place 0.25 g of the sample in the digestion flask. Add 0.7 Gm mercuric oxide, 15 gm potassium sulphate followed by 25 ml of sulphuric acid. Shake, let stand for about 30 minutes and heat carefully until frothing ceases. Boil briskly until the solution clears and continue boiling further for 90 minutes. Cool, add about 200 ml of water, cool to room temperature and add a few zinc granules.

## (b) Tilt the flask and carefully add 50 ml of sodium hydroxide solution without agitation. Immediately connect the flask to the distillation bulb on the condenser whose tip is immersed in 50 ml of standard 0.1 N acid in the receiving flasks. Rotate the digestion flask carefully to mix the contents. Heat until 150 ml of the distillate collects and titrate excess acid with 0.1 N base using methyl red or mixed indicator. Carry out blank determination on reagents.

Note : Check the ammonia recording periodically, using inorganic nitrogen control, for example, ammonium sulphate.

## (c) Calculation:-

(i) Nitrogen content, percent by mass =

$$\frac{(\text{Mililiters of } 0.1\text{N acid for sample} - \text{mililiters of } 0.1\text{ N acid for blank}) \times 0.14}{\text{mass of sample taken}}$$

(ii) Total nitrogen in culture = Total dry mass of sample x percent nitrogen.

## (d) Take a 1.0 g of accurately weighed sample each from the inoculated series and from the controls. Put them separately in 250 ml volumetric flask, add 150 ml water, mix the content and make up the volume to 250 ml water. Shake for 5 minutes and centrifuge for 15 minutes at 10000 rev/min. Estimate glucose in the supernatant in triplicate. The difference between the two provides the data of actual amount of glucose consumed. Calculate the amount of nitrogen fixed per gram of sucrose consumed.

## 5.5. Determination of Glucose:-From the supernatant, draw suitable aliquots and estimate reducing sugars (glucose) as follows.

## (i) Reagents

(ii) Soxhlet modification of Fehling solution:-Prepare by mixing equal volumes of Solution A and Solution B immediately before using.

(iii) Copper sulphate solution (Solution A)-Dissolve 34.639 g of copper sulphate crystals ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) in water, dilute to 500 ml and filter through glass wool or filter paper.

**Standardization of copper sulphate solution:-** Using separate pipettes, pipette accurately 5 ml of Solution A and 5 ml of Solution B into a conical flask of 250 ml capacity. Heat this mixture to boiling on an asbestos gauze and add standard invert sugar solution from a burette, about 1 ml less than the expected volume which will reduce the Fehling solution completely (about 48 ml). Add 1 ml of methylene blue indicator while keeping the solution boiling. Complete the titration within 3 minutes, the end point being indicated by change of colour from the blue to red. From the volume of invert sugar solution used, calculate the strength(s) of the copper sulphate solution by multiplying the titre value by 0.001 (mg/ml of the standard invert sugar solution). This would give the quantity of invert sugar required to reduce the copper in 5 ml of copper sulphate solution.

- (iv) Potassium sodium tartrate (Rochelle salt) Solution (Solution B):- Dissolve 173 g of potassium sodium tartrate and 50 g of sodium hydroxide in water, and dilute to 500 ml. Let the solution stand for a day, and filter.
- (v) Hydrochloric acid-sp gr 1.18 at 20°C (approximately 12 N)
- (vi) Standard invert sugar solution-Weigh accurately 0.95 g of sucrose and dissolve it in 500 ml of water. Add 32 ml of concentrated hydrochloric acid, boil gently for 30 minutes and keep aside for 24 hours. Neutralize with sodium carbonate and make the final volume to 1000 ml; 50 ml of this solution contains 0.05 g of invert sugar.
- (vii) Methylene blue indicator- 0.2 percent in water.
- (viii) Procedure:- Place about 1 g (M), accurately weighed, of the prepared sample of AI into a 250 ml volumetric flask and dilute with about 150 ml of water. Mix thoroughly the contents of the flask and make the volume of 250 ml with water. Using separate pipettes, take accurately 5 ml each of Solution A and Solution B in a porcelain dish. Add about 12 ml of AI solution from a burette and heat to boiling over an asbestos gauze. Add 1 ml of methylene blue indicator and while keeping the solution boiling complete the titration within 3 minutes, the end point being indicated by change of colour from blue to red. Note the volume (H) in ml of AI solution required for the titration.
- (ix) Calculation

$$\text{Total reducing sugars, percent by mass} = \frac{250 \times 100 \times S}{H \times M}$$

Where

S = strength of copper sulphate solution,  
 H = volume in ml of AI solution required for titration, and  
 M = mass in g of AI taken for the test.

### 5.6. Determination of Sucrose

- (i) Procedure:- To 100 ml of the stock AI solution , add 1 ml of concentrated hydrochloric acid and heat the solution to near boiling. Keep aside overnight. Neutralize this solution with sodium carbonate and determine the total reducing sugars as described in
- (ii) Calculation
  - (a) Sucrose, percent by mass= (reducing sugars after inversion, percent by mass) - (reducing sugars before inversion, percent by mass) x 0.95.
  - (b) Nitrogen, mg per gram of sucrose consumed =  $2(a - b) - C$   
where  
 a = initial quantity of sucrose taken for the test,  
 b = mass of sucrose as calculated in (a), and  
 c = amount of nitrogen fixed per gram of glucose.

## 1. C . METHOD OF ANALYSIS OF AZOSPIRILLUM BIO-FERTILISER

1. APPARATUS : same as Rhizobium

### 2. REAGENTS

#### 2.1 . Medium

Use a plating medium of the following composition

|  |         |
|--|---------|
| D-Malic acid                                     | 5.0 g   |
| Potassium hydroxide                              | 4.0 g   |
| Di-potassium hydrogen phosphate                  | 0.5 g   |
| Ferrous sulphate                                 | 0.05 g  |
| Manganese sulphate                               | 0.01 g  |
| Magnesium sulphate                               | 0.1 g   |
| Sodium chloride                                  | 0.2 g   |
| Calcium chloride                                 | 0.1 g   |
| Sodium molybdate                                 | 0.002 g |
| Distilled water                                  | 1000ml  |
| Boromothymol blue<br>(0.5 % alcoholic solution ) | 2.0 ml  |
| Agar   | 1.7 g   |
| pH adjusted to 6.5 – 7.0                         |         |

#### 2.2. Sterilising and preparation procedure for plates:

same as Rhizobium

### PREPARATION OF PLATING MEDIUM AND POURING

Same as Rhizobium

**3. PREPARATION OF SERIAL DILUTIONS FOR PLATE COUNTS:**  
same as Rhizobium

**4. INCUBATION OF PLATES:-** Same as 4.1, p-26

4.1. Label the plates and incubate at  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  for 4 to 6 days.

4.2. Colony counting aids : Same as 4.2, p-26

**COUNTING**

Counting the tubes or plates which have turned blue in colour after inoculation and ascertain the presence of pellicles in undisturbed medium. To determine usual contamination on the same examine doubtful objects carefully.

Count all plates / tubes which have turned blue and consider them for the purpose of calculation. Count such type of tubes/ plates and tally this count with MPN table Annex-E to get the number of cells per gram of the carrier.

$$\text{Azospirillum Count/g of carrier} = \frac{\text{MPN table value} \times \text{Dilution level}}{\text{Dry mass of product}}$$

**1. D. METHOD OF ANALYSIS OF PHOSPHATE SOLUBULISING BACTERIAL BIO-FERTILISER**

1. APPARATUS: same as Rhizobium

**2. REAGENTS**

**2.1. Medium**

Use a plating medium of the following composition:

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Glucose               | 10.0 g  |
| Tri-calcium phosphate | 5.0 g   |
| Ammonium sulphate     | 0.5 g   |
| Magnesium sulphate    | 0.1 g   |
| Sodium Chloride       | 0.2 g   |
| Yeast extract         | 0.5 g   |
| Manganese sulphate    | Trace   |
| Ferrous sulphate      | Trace   |
| Distilled water       | 1000 ml |
| Agar                  | 15.0 g  |

pH adjusted to 7 +/- 0.2

2.2. Sterilising & preparation procedure for plates:  
same as Rhizobium

## **PREPARATION OF PLATING MEDIUM AND POURING**

Same as Rhizobium

### **3. PREPARATION OF SERIAL DILUTIONS FOR PLATE COUNTS:**

same as Rhizobium

### **4. INCUBATION OF PLATES:-**

4.1. Label the plates and incubate at  $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$  for 4 to 6 days.

4.2. Colony counting aids : Same as Rhizobium

#### **Counting**

Count the total number of colonies on the plates including colonies with solubilisation zone with the help of a colony counter.

Methods for counting solubilisation zones

- a. Take 10 g of PSBI (BF) in 90 ml in water
- b. Make a ten fold dilution series up to  $10^7$
- c. Take 0.2 ml aliquote of  $10^5$  to  $10^7$  dilution using sterile pipettes and delivered to Petri dishes containing pikowskeyi media.
- d. Spread it uniformly , Invert the plates and incubate them up to 2 weeks at  $28 + / - 2^{\circ}\text{C}$ .
- e. Count the colonies showing hallow cones and measure their diameter.  
Minimum acceptable zone is 10 mm in diameter.

## **5. DETERMINATION OF SOLUBLE PHOSPHOROUS USING ASCORBIC ACID**

### **5.1 APPARATUS**

Spectrophotometer capable of transmission measurements at 840 to 880 nm.

Extractant : It is olsen extract.

### **5.2 REAGENTS**

Ammonium Molybdate  $[(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$

L-Ascorbic Acid

p-Nitrophenol

$4\text{NH}_2\text{SO}_4$

### **5.3 PREPARATION OF REAGENTS**

#### **5.3.1. Sulphomolybdic Acid :-**

-Take 20 g of ammonium molybdate and dissolve in 300 ml of distilled water.

- Add slowly 450 ml of 10 N  $H_2SO_4$ .
- Cool the above mixture and add 100 ml of 0.5 percent solution of antimony potassium tartrate.
- Coll and make the volume to one litre. Store in glass bottle away from direct sunlight.

### 5.3.2. Preparation of Mixed Reagent

Add 1.5 g of L-ascorbic acid in 100 ml of the above stock solution and mix. Add 5 ml of this solution to develop colour. Mixed reagent is to be prepared fresh as it does not keep for more than 24 h.

### 5.3.3. Procedure

- (i) Weight the required material in a 100 ml conical flask.
- (ii) Add 50 ml of extractant and shake it for 30 min. on a rotary shaker.
- (iii) Filter the suspension through Whatman filter paper No.40. If the filtrate is coloured then add a tea spoon of Dacro-60 (activated phosphorus free carbon), reshake and filter.
- (iv) Take a known aliquot (5 to 25 ml) of the extract in a 50 ml volumetric flask.
- (v) Add 5 drops of *p*-nitrophenol indicator (1.5 percent solution in water) and adjust the pH of the extract between 2 and 3 with the help of  $4NH_2SO_4$ . The yellow colour will disappear when the pH of the solution becomes 3. Swirl gently to avoid loss of the solution along with the evolution of  $CO_2$ .
- (vi) When the  $CO_2$  evolution has subsided, wash down the neck of the flask and dilute the solution to about 40 ml.
- (vii) Add 5 ml of the sulphomolybdic acid mixed reagent containing ascorbic acid, swirl the content and make up the volume.
- (viii) Measure the transmission after 30 min at 880 nm using red filter. The blue colour developed remains stable up to 60 minutes.
- (ix) Record the concentration of Phosphorus (P) in the extract from the standard curve and calculate the concentration of soluble Phosphorus as follows:

### 5.3.4. CALCULATIONS

- |     |   |  |       |
|-----|---|--|-------|
| (a) | Weight of the substance taken   | =  | xg    |
| (b) | Volume of the extractant added  | =  | 50 ml |
| (c) | Volume of the extract taken for P determination                       | =  | y ml  |
| (d) | Volume made after colour developed                                    | =  | 50 ml |
| (e) | Reading from the standard curve against percent transmission recorded | =  | z ppm |
| (f) | Soluble Phosphorus, percent P =                                       | $\frac{z \times 50 \times 10^{-6} \times 50}{y \times x} \times 100$ |       |

### 5.3.5 Preparation of Standard Curve

Prepare standard curve using 0.1 to 0.6 ppm P in 50 ml volumetric flask. Plot the standard curve by taking concentration of soluble P on x-axis and percent T on y-axis using a semi-log graph paper. It is a straight line relationship between the soluble P and percent T when plotted on a semi-log graph paper.

## 6. MAINTENANCE AND PREPARATION OF CULTURE AND QUALITY CONTROL AT BROTH STAGE

### **RHIZOBIUM:**

#### **1. Maintenance of pure cultures**

- 1.1. Maintain pure cultures of rhizobia on yeast extract mannitol agar (YEMA) slants of the following composition.

|   |           |
|---|-----------|
| Mannitol                                    | 10.0 g    |
| Potassium hydrogen phosphate ( $K_2HPO_4$ ) | 0.5 g     |
| Magnesium sulphate ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) | 0.2 g     |
| Sodium chloride ( $NaCl$ )                  | 0.1 g     |
| Calcium carbonate ( $CaCO_3$ )              | 1.0 g     |
| Yeast extract                               | 1.0 g     |
| Agar  | 18.0 g    |
| Distilled water                             | 1 litre   |
| pH  | 6.8 – 7.0 |

- 1.2. Transfer a loopful of the pure culture to each of the agar slants aseptically in an inoculation room and incubate at  $28 \pm 2^\circ C$  for 3 to 10 days depending upon the species of Rhizobium. Always keep pure cultures at  $4^\circ C$ .

#### **2. Preparation of Inoculum Cultures**

- 2.1 Prepare yeast mannitol broth of the composition as given in 1.1. minus the agar.

- 2.2 Transfer a loopfull of the culture.

#### **3. Quality Control Tests Recommended at Broth Stage:**

##### **3.1 Qualitative Tests**

- 3.1.1. Check for freedom from visible contaminants
- 3.1.2. The pH of the bacterial broth shall normally be between 6.5 and 7.5
- 3.1.3. Smear and Gram stain
- 3.1.3.1 . Reagents

a. Ammonium oxalate crystal violet stain weigh 0.2 g of crystal violet and dissolve in 20 ml of 95 percent ethyl alcohol. Dissolve separately 0.8 g of ammonium oxalate in 80 ml of distilled water. Mix the two solutions and filter through a filter paper.

##### **b. Iodine solution**

|                  |        |
|------------------|--------|
| Iodine           | 1.00 g |
| Potassium Iodide | 2.00 g |
| Distilled water  | 300 ml |

Weigh the ingredients and dissolve in water . Filter through a filter paper.

c) Erythrosine

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Erythrosine     | 1.00 g |
| Phenol          | 5.00 g |
| Distilled water | 100 ml |

Weigh the ingredients, dissolve in distilled water and filter through a filter paper.

3.1.3.2. Procedure

Prepare a smear on a clean microscope slide, fix over a flame by gentle and intermittent heating , air cool and flood with ammonium oxalate crystal violet stain for 1 min. After removing the excess of ammonium oxalate crystal violet , wash the slide under a gentle stream of running tap water. Flood the slide with iodine solution for half a minute remove excess stain wash with 95 percent ethyl alcohol and finally wash under a gentle stream of running tap water. Flood the slide with erythrosine stain for about 3 min, wash under a gentle stream of running tap water and dry between the folds of a filter paper. Examine the slide under a compound microscope using an oil immersion objective.

Note:- A smear prepared from undiluted broth should be free from Gram positive cells . The presence of a few gram positive cells in occasional fields which may be due to dead cells in the medium may be disregarded .

3.1.4. Absence of Growth on Glucose – Peptone Agar

The composition of the glucose – peptone agar is as follows:

|                        |   |
|------------------------|---|
| Glucose                | 10.0 g                                      |
| Peptone                | 20.0 g                                      |
| Sodium chloride (NaCl) | 5.0   |
| Agar (IS 6850)         | 15.0  |
| Distilled water        | 1000 ml                                     |
| Bromocresol purple     | 10 ml of 1.6 persons ethyl alcohol solution |
| pH                     | 7.2   |

Note:- When a loopful of the broth is streaked into this medium and incubated at 28 +/- 2° C for 24 h , the purple – violet colour of the medium (due to the indicator bromocresol purple) shall not change. If the colour changes to yellow (acidic reaction) or blue (alkaline reaction) the broth is grossly contaminated. Hence, the broth should be rejected.

3.1.5. Streak on yeast Extract mannitol Agar with Congo Red

When a loopful of broth culture is streaked to a plate of this medium and incubated at 28 +/- 2° C for 3 to 10 days , it shall show colonies of bacteria with growth characteristics

same as that of the pure culture used in the preparation of the broth, Other wise, the broth should be rejected.

### 3.2 Quantitative Test

#### 3.2.1. Viable or Plate Counts

Serially dilute one milliliter of the broth to obtain dilutions of the order of  $10^6$  to  $10^9$ . Plate 0.2 ml aliquots of the dilutions on YEMA plates and incubate at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  for 2 to 6 days , depending on the species of Rhizobium. The counts of viable Rhizobium in the final broth from shake culture or fermentors shall be not less than  $10^8$  to  $10^9$  cells / ml. Other wise , the broth should be rejected.

## AZOSPIRILLUM

### 1. Maintenance of pure cultures

1.1. Maintain pure culture of Azospirillum on nitrogen free bromothymol blue medium and maintain as semi solid medium

1.2. Transfer a loopful of pure culture to each of the agar culture tube aseptically in an inoculation room and incubate  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  for three days and keep it undisturbed . Always keep pure culture below  $5^\circ\text{C}$ .

### 2. Preparation of Inoculum culture and Mass culture :

Inoculum culture and mass culture of this standard shall be prepared as described for Rhizobium of this standard.

### 3. Quality Control Test Recommended at Broth Stage

#### 3.1. Qualitative Test

3.1.1 Check for free from contaminants by preparing slide and observing under microscope .

3.1.2 The pH of bacterial broth shall normally be between 7.0 to 8.0.

3.1.3 Gram staining test shall be carried out as described for Rhizobium of this standard.

3.1.4 See the colour change in the media after 24 hours from inoculation. The colour will change from green to blue.

3.1.5. Watch the pellicle just below the surface of the media . It is checked on the third day after keeping inoculated broth undisturbed.

#### 3.2. Quantitative Test

3.2.1. Most probable Number (MPN) as given in Annexure-E. The counts of Azospirillum in the final broth from shake culture or fermentoies shall be not less than  $10^8$  to  $10^9$  cells / ml. Other wise the broth shuld be rejected.

### AZOTOBACTER

#### 1. Maintenance of pure cultures.

##### 1. 1 Maintain pure cultures of Aztobactor on slants of the following composition

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| Agar                         | 20 gm    |
| Sucrose                      | 20 gm    |
| Ferrous Sulphate             | 0.1      |
| Dibasic Potassium Phosphate. | 1.0 gm   |
| Magnesium Sulphate           | 0.5 gm   |
| Clacium carbonate            | 2.0 gm   |
| Sodium Molybdate             | 0.005 gm |

1.2 Transfer a loopful the pure culture to each of agar slantas aseptically in an inoculator room and incubate at  $28 + / - 2^\circ\text{C}$  for 3 to 10 days depending upon the species of Azotabactor. Always keep culture pure cultures at  $5^\circ\text{C}$

#### 2. Preparation of inoculum culture

2.1 Prepare Jensens media broth of the compositor as given in 1.1 minus the agar

2.2 Transfer a loop full of the culture into a 100ml/ 250 m; conical flask containing the broth. Incubate the flasks at  $28 + / - 2^\circ\text{C}$  on a rotary shaker for 2 to 6 days.

3. Quality control Tests recommended by Broth stage.

3.1 Qualitative test

3.1.1 Check for free from containments by preparing slide and observing under microscope.

3.1.2 The pH by bacterial broth shall normally be between 6.5 to 7.0

3.1.3 Gram staining test shall be carried out as described for Rhizobium of this standard.

3.2 Quantitative test

3.2.1. Viable cell count same as Rhizobium

#### 4. Packing, Marking, Storage and use

##### 4.1 PACKING

Biofertiliser shall be packed in polyethylene packs, thickness which shall not be less than 75-100 micron.

##### 4.2 MARKING

Each polyethylene pack shall be marked legibly and indelibly with the following information:

(a) Name of the product,

- (b) Name and address of the manufacturer;
- (c) Crop(s) for which intended;
- (d) Type of the carrier used;
- (e) Batch number;
- (f) Date of manufacture;
- (g) Expiry date which shall not be more than 6 months from the date of manufacture;
- (h) Net mass in kg/gram and area meant for;
- (i) Storage instruction worded as under:  
“STORE IN COOL PLACE AWAY FROM DIRECT SUN LIGHT AND HEAT”
- (j) Any other information required under the *standards of Weights and Measures (Packaged Commodities) Rule, 1977.*

4.3 Items (c), (f) and (g) shall be printed on a coloured ink background.

4.4 Direction for use of biofertiliser shall be printed briefly on the packets as given below.

“The contents of the packet are sufficient enough for seed treatment on to the given area to be broadcasted or given seedlings for root dipping depending on the specified crops as denoted on the packet. Mix the inoculants with seeds gently with the minimum amount of water, taking care to avoid damage to seed coat. Dry the inoculated seed under shade over clean surface gunny bag and sow them immediately.

Use only for the crops mentioned. Use before the expiry date and do not expose to direct sun light or heat.

Biofertiliser is not a chemical fertilizer hence do not mix inoculated seeds or inoculant with agro-chemicals.”

#### 4.5 Storage

Inoculant shall be stored by the manufacturer in a cool and dry place away from direct heat preferably at temperature of 20°C. It shall also be the duty of the manufacturer to instruct the retailers and, in turn, the users about the precautions to be taken during storage.

**Schedule – IV**  
**[see clause 2(h) and (q)]**  
**Part – A**

## SPECIFICATION OF ORGANIC FERTILISER

### 1. City compost:

|       |                              |                       |
|-------|------------------------------|-----------------------|
| (i)   | Moisture, per cent by weight | 15.0-25.0             |
| (ii)  | Colour                       | Dark brown to black   |
| (iii) | Odour                        | Absence of foul odour |

|        |  |  |     |
|--------|--|--|-----|
| (iv)   | Particle size  | Minimum material should pass through 4.0 mm IS Sieve | 90% |
| (v)    | Bulk Density (g/cm <sup>3</sup> )  | 0.7 -0.9   |     |
| (vi)   | Total Organic Carbon,<br>Per cent by weight, Minimum                               | 16.0   |     |
| (vii)  | Total Nitrogen (as N)<br>Per cent by weight, Minimum                               | 0.5  |     |
| (viii) | Total Phosphates(as P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )<br>Per cent by weight, Minimum | 0.5  |     |
| (ix)   | Total Potash (as K <sub>2</sub> O)<br>Per cent by weight, Minimum                  | 1.0  |     |
| (x)    | C:N ratio  | 20 : 1 or less                                       |     |
| (xi)   | pH   | 6.5 - 7.5  |     |
| (xii)  | Conductivity (as dsm <sup>-1</sup> ),<br>Not more than                             | 4.0  |     |
| (xiii) | Pathogens  | Nil  |     |
| (xiv)  | Heavy metal content, (as mg/Kg)<br>per cent by weight, Maximum                     |  |     |
|        | Arsenic (as As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )                                       | 10.00  |     |
|        | Cadmium (as Cd)  | 5.00   |     |
|        | Chromium (as Cr)   | 50.00  |     |
|        | Copper (as Cu)   | 300.00   |     |
|        | Mercury (as Hg)  | 0.15   |     |
|        | Nickel (as Ni)   | 50.00  |     |
|        | Lead (as Pb)   | 100.00   |     |
|        | Zinc (as Zn)   | 1000.00  |     |

## 2. Vermicompost :

|        |  |  |
|--------|--|--|
| (i)    | Moisture, per cent by weight   | 15.0-25.0  |
| (ii)   | Colour   | Dark brown to black                                      |
| (iii)  | Odour  | Absence of foul odour                                    |
| (iv)   | Particle size  | Minimum 90% material should pass through 4.0 mm IS Sieve |
| (v)    | Bulk Density (g/cm <sup>3</sup> )  | 0.7 -0.9   |
| (vi)   | Total Organic carbon,<br>per cent by weight, Minimum                               | 18.0   |
| (vii)  | Total Nitrogen (as N)<br>per cent by weight, Minimum                               | 1.0  |
| (viii) | Total Phosphate (as P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )<br>per cent by weight, Minimum | 1.0  |
| (ix)   | Total Potassium (as K <sub>2</sub> O)<br>per cent by weight, Minimum               | 1.0  |
| (x)    | Heavy metal content, (as mg/Kg)<br>per cent by weight, Maximum                     |  |
|        | Arsenic (as As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )                                       | 10.00  |
|        | Cadmium (as Cd)  | 5.00   |
|        | Chromium (as Cr)   | 50.00  |

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Mercury (as Hg) | 0.15   |
| Nickel (as Ni)  | 50.00  |
| Lead (as Pb)    | 100.00 |

3. **Pressmud :**

|   |         |
|---|---------|
| (i) Moisture, per cent by weight, Maximum   | 15.0    |
| (ii) Total Nitrogen (as N)<br>per cent by weight, Minimum                                 | 1.80    |
| (iii) Total Phosphorous(as P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )<br>per cent by weight, Minimum | 2.00    |
| (iv) C:N ratio, Minimum   | 10:1    |
| (v) Total Potassium (as K <sub>2</sub> O)<br>per cent by weight, Minimum                  | 1.40    |
| (vi) PH   | 7.0-8.0 |
| (vii) Heavy metal content, (as mg/Kg)<br>per cent by weight, Maximum                      |         |
| Arsenic (as As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )  | 10.00   |
| Cadmium (as Cd)   | 5.00    |
| Chromium (as Cr)  | 50.00   |
| Copper (as Cu)  | 300.00  |
| Mercury (as Hg)   | 0.15    |
| Nickel (as Ni)  | 50.00   |
| Lead (as Pb)  | 100.00  |
| Zinc (as Zn)  | 1000.00 |

**Part – B**

**TOLERANCE LIMIT OF ORGANIC FERTILISER**

**0.1 unit for combined Nitrogen, Phosphorus and Potassium Nutrients**

**Part – C**

**PROCEDURE FOR DRAWL OF SAMPLE OF ORGANIC  
FERTILISER**

(As per methodology as mentioned under schedule – II, Part – A of FCO, 1985.)

The Inspector shall draw any sample of Organic Fertiliser in accordance with the procedure of drawal mentioned under Schedule – II, Part – A.

**Part - D****METHODS OF ANALYSIS OF ORGANIC FERTILISER****1. Estimation of pH**

- Make 25 g of compost into a suspension in 50 ml of distilled water and shake on a rotary shaker for 2 hours.
- Filter through Whatman No. I or equivalent filter paper under vacuum using a Buchner funnel
- Determine pH of the filtrate by pH mete.

**2. Estimation of moisture****Method :**

Weigh to the nearest mg about 5 gm of the prepared sample in a weighed clean, dry Petri Dish. Heat in an oven for about 5 hours at  $65^{\circ} +, - 1^{\circ}$  C to constant weigh. Cool in a desicator and weigh. Report percentage loss in weight as moisture content.

**Calculation :**

$$\text{Moisture percent by weight} = \frac{100(B-C)}{B-A}$$

A = Weight of the Petri Dish

B = Weight of the Petri Dish plus material before drying

C = weight of the Petri Dish plus material after drying

**3. Estimation of Bulk density****Requirement**

|   |                  |
|---|------------------|
| -100ml Measuring cylinder                 | Weighing balance |
| -Rubber pad [1 Sq foot; 1 inch thickness] | Hot air oven     |

**Method**

- Weigh a dry 100ml cylinder (W1 gill)
- Cylinder is filled with the sample up to the 100ml mark. Note the volume (V1 ml)
- Weigh the cylinder along with the sample (W2 gm)
- Tap the cylinder for two minutes.
- Measure the compact volume (V2 ml)

**Calculation**

$$\text{Bulk density} = \frac{\text{Weight of the sample taken (W2 - W1)}}{\text{Volume (V1 - V2)}}$$

**4. Estimation of Eh**

**Requirements**

- 250 ml flak
- Funnel [OD – 75 mm]
- 100 ml Beaker
- Analytical Balance
- Potassium Chloride [AR grade]
- Filter paper
- Conductivity meter [With temperature compensation system]

**Method**

- Pass fresh sample of organic fertilizer through a 2-4mm sieve.
- Take 20gm of the sample and add 100ml of distilled water to it to give a ratio of 1:5
- Stir for about an hour at regular intervals.
- Calibrate the conductivity meter by using 0.01M potassium chloride solution.
- Measure the conductivity of the unfiltered organic fertilizer suspension.

**Calculation**

Express the results as millimho's or ds/cm at 25°C specifying the dilution of the organic fertilizer suspension viz., 1:5 organic fertilizer suspension.

**5. Estimation of Organic Carbon****Apparatus:-**

- (i) Conical flask 500 ml
- (ii) Pipettes - 2, 10 and 20 ml
- (iii) Burette - 50 ml.

**Reagents:-**

- (i) Phosphoric acid (Ortho) - 85%
- (ii) Sodium Fluoride Solution - 2
- (iii) Sulphuric Acid AR - 96% containing 1.25% Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- (iv) Standard IN K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Dissolve 49.04 g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> in water and dilute to 1 litre.
- (v) Standard 0.5 N Ferrous ammonium sulphate - Dissolve 196.1 g Fe. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O in 800 ml water containing 20 ml conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and dilute to 1 litre.
- (vi) Diphenylamine indicator - Dissolve 0.5 g reagent grade diphenylamine in 20 ml water and 100 ml conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**Procedure:-**

Grind air dry compost and sieve with 80 mesh (2mm sieve). Take 0.5 g sample in 500 ml conical flask. Add 50 ml of I(N) K<sub>2</sub> Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> with burette and swirl a little. Then add 50 ml conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and swirl again 2-3 times. Allow to stand for 30 minutes in a dark place and thereafter add 200 ml water. Then the volume was made upto 500 ml in a volumetric flask. Out of this 50 ml a aliquot (equivalent to 0.1 g sample) was taken in another 500 ml conical flask. Add 15 ml of orthophosphoric acid and 1ml of Diphynelamine indicator. Titrate with 0.5 N Ferrous Ammonium Sulphate till the colour flashes blue violet to green. Simultaneously run a blank without compost sample.

**Calculation:-**

$$\frac{10(BT)}{B} \times 0.003 X \frac{100}{\text{Weight of sample}} \times 1.3$$

Organic Carbon % =

Where B = Volume (ml) of ferrous ammonium sulphate solution required for blank titration.

T = Volume (ml) of ferrous ammonium sulphate required for sample.

Source : Tandon, Methods of Soil, Plant, Fertilizer and Water Analysis p-16

### 7. Estimation of total nitrogen

As mentioned under Schedule – II, Part – B, 3 (v) of FCO (1985)

### 8. Estimation of C: N ratio

#### Method

Calculate the C: N ratio by dividing the organic carbon value with the total nitrogen value.

### 9. Estimation of Phosphate

As mentioned under Schedule – II, Part B, 4 (D)(ii) of FCO (1985)

Note : In the final aliquot for titration the concentration  $P_2O_5$  should be 25-30 ml.

### 10. Estimation of Potassium

**Flame Photometry Method :-** Total Potassium are usually determined by dry ashing at 650-700 Degree Centigrade and dissolving in concentrated hydrochloric acid .

#### Reagent and Standard Curve.

(1) Potassium Chloride Standard Solution: Make a stock solution of 1000 ppm K by dissolving 1.909 g. of AR Grade potassium chloride (dried at 60 Degree C. for 1 h) in distilled water l; and diluting up to 1 liter . Prepare 100 ppm Standard by didiluting 100 ml of 1000 ppm stock solution to 1 litre with extracting solution.

(2) Standard curve: Pipette 0,5,10,15 and 20 ml of 100 ppm solution into 100 ml volumetric flasks and make up the volume upto the mark. The solutions contain 0, 5, 15, & 20 ppm K respectively.

#### Procedure

\* Take 5g sample in a porceline crucible and ignite the material to ash at 650-700 C. in a muffle furnace .

- Cool it and dissolve in 5 ml concentrated hydrochloric acid, transfer in a 250 ml beaker with several washing of distilled water and heat it .Again transfer it to a 100 ml volumetric flask and make up the volume .
- Filter the solution and dilute the filtrate with distilled water so that the concentration of K in the working solution remains in the range of 0 to 20 ppm, if required.
- Determine K by the flame photometer using the K – filter after necessary setting and calibration of the instrument.
- Read similarly the different concentration of K of the standard solution in flame photometer and prepare the standard curve by plotting the readings against the different concentration of the K.

**Calculation:** Potash (K) % by weight =  $R \times 20 \times \text{diluting factor}$  ,  
where R = ppm of K in the sample solution ( obtained by extra plotting from stand curve)

## 11. Estimation of Heavy Metals

- Arsenic:-** As mentioned under Schedule – II, Part B, 3 (xiv) of FCO (1985)
- Cadmium:-** As mentioned under Schedule – II, Part B, 8 (x) of FCO (1985)
- Copper:-** As mentioned under Schedule – II, Part B, 8 (iv) of FCO (1985)
- Lead:-** As mentioned under Schedule – II, Part B, 8 (v) of FCO (1985)
- Zinc:-** As mentioned under Schedule – II, Part B, 8 (ii) of FCO (1985)

## Chromium & Nickle

### MATERIALS REQUIRED

- (a) Triacid mixture: Mix 10 parts of  $\text{HNO}_3$  (Nitric acid), 1 part  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Sulphuric acid) and 4 parts of  $\text{HClO}_4$  (Perchloric acid).
- (b) Conical flask, 250 ml
- (c) Hot Plate
- (d) Whatman Filter paper No. 42
- (e) Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS)

### PROCESSING OF SAMPLE

Take 5.0 g or suitable quantity of oven dried ( $105^{\circ}\text{C}$ ) sample thoroughly ground and sieved through 0.2 mm sieve in a conical flask.

Add 30 ml triacid mixture, cover it with a small glass funnel for refluxing. Digest the sample at  $200^{\circ}\text{C}$  on a hot plate till the volume is significantly reduced with a whitish residue.

After cooling, filter the sample with Whatman No. 42 filter paper, make up to 100 ml in a volumetric flask

### MEASUREMENT

Estimate the metal concentrations of Cd, Cu, Cr, Fe, Pb, Ni, Zn using Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) as per the procedure given for instrument. Run a blank following the same procedure.

### EXPRESSION OF RESULTS

Express the metal concentration as mg/g on oven dry weight basis in 3 decimal units

(Reference: Manual for Analysis of Municipal Solid Waste (compost) – Central Pollution Control Board)

## Mercury

### REAGENTS

- (a) Conc. Nitric acid ( $\text{HNO}_3$ )
- (b) Conc. Sulphuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- (c) Potassium persulphate (5% solution): Dissolve 50 g of  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  in 1 litre of distilled water.
- (d) Potassium permagnate (5% solution): Dissolve 50 g of  $\text{KMnO}_4$  in 1 litre of distilled water.
- (e) Hydroxylamine Sodium Chloride solution: Dissolve 120 g of Hydroxyl amine salt and 120 g of Sodium Chloride ( $\text{NaCl}$ ) in 1 litre distilled water.
- (f) Stannous chloride (20%): Dissolve 20 g of  $\text{SnCl}_2$  in 100 ml distilled water

### MATERIAL REQUIRED

- (a) Water Bath
- (b) Flameless Atomic Absorption Spectrophotometer or Cold vapour Mercury analyzer.
- (c) BOD bottle, 300 ml

### PROCESSING OF SAMPLE

- (a) Take 5 g (finely ground but not dried) sample in an oven at a temperature of 105°C for 8 hours for moisture estimation.
- (b) Take another 5 g sample ((finely ground but not dried) in a BOD bottle, add to it 2.5 ml of conc. HNO<sub>3</sub>, 5ml of conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 15 ml of 5% KMnO<sub>4</sub>.
- (c) After 15 minute add 8 ml of 5% K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.
- (d) Close the bottle with the lid and digest it on a water bath at 95°C, for 2 hours.
- (e) After cooling to room temperature add 5 ml hydroxylamine sodium chloride soln.

### MEASUREMENT

Reduction of the digested sample is brought out with 5 ml of 20% SnCl<sub>2</sub> immediately before taking the readings, using a cold vapour mercury analyzer

### EXPRESSION OF RESULTS

Express the mercury concentration as mg/g on oven dry weight basis in 3 decimal units

(Reference: Manual for Analysis of Municipal Solid Waste (compost) – Central Pollution Control Board)

16. In the said Order, for Form D, the following form shall be substituted, namely :-

### “EMBLEM FORM ‘D’

[See clause 14(2) and 18(1)]

### FORM OF APPLICATION TO OBTAIN A CERTIFICATE OF MANUFACTURE OF PHYSICAL/GANULATED MIXTURE OF FERTILISER OF ORGANIC FERTILISER /BIO-FERTILISER

To

The Registering Authority

Place \_\_\_\_\_

State of \_\_\_\_\_

- (1) Full Name and address of the applicant:
- (2) Does the applicant possess the qualification prescribed by the State Government under sub-clause (1) of clause 14 of the Fertiliser control under, 1985.
- (3) Is the applicant a new comer? (Say ‘Yes’ or ‘No’)
- (4) Situation of the applicant’s premises where physical/granulated mixture organic fertiliser/Biofertiliser will be prepared:
- (5) Full particulars regarding specifications of the physical/granulated mixture of fertilisers/organic fertiliser/Bio-fertiliser for which the certificate is required and the raw materials used in making the mixture.

- (6) Full particulars of any other certificate of manufacture, if any, issued by any other Registering Authority;
- (7) How long has the applicant been carrying on the business of preparing physical/granulated mixture of fertilisers/organic fertiliser/ Bio-fertiliser mixture of micronutrient fertilisers?
- (8) Quantities of each physical/granulated mixture of fertilisers/mixture of micronutrient fertilisers/organic fertilisers/ Bio-fertilisers (in tonnes) in my/our possession on the date of the application and held at different addresses noted against each;
- (9)
  - (i) If the applicant has been carrying on the business of preparing physical/granulated mixtures of fertilisers/ mixture of micronutrient fertilisers /organic fertiliser/ Bio-fertiliser, give all particulars of such mixtures handled, the period and the place (s) at which the mixing of fertilisers was done;
  - (ii) Also give the quantities of physical/granulated fertiliser mixture organic fertiliser/Bio-fertiliser handled during the past calendar year;
- (10) If the application is for renewal, indicate briefly why the original certificate could not be acted on within the period of its validity.

***Declaration***

- (a) I have deposited the prescribed registration certificate fee/renewal fee.
- (b) I/we declare that the information given above is true and correct to the best of my/our knowledge and belief, and no part there is false.
- (c) I/we have carefully read the terms and conditions of the certificate of manufacture given in Form F appended to the Fertiliser (control) order, 1985 and agree to abide by them.
- (d) I/we declare that the physical/granulated mixture/organic fertiliser/Bio-fertiliser for which certificate of manufacture is applied for shall be prepared by me/us or by a person having such qualifications as may be prescribed by the State Government from time to time or by any other person under my/our direction, supervision and control or under the direction, supervision and control of person having the aid qualification.
- (e) I/we declare that the requisite laboratory facility specified by the Controller, under this Order is possessed by me/us.

***Name and address of applicant  
in block letters:***

Date:  
Place:

*Signature of applicant (s)"*

17. In the said Order, for Form F, the following form shall be substituted, namely: -

**"FORM 'F'**

(See clause 15(2) and 18(2))

Book No. \_\_\_\_\_ Certificate No. \_\_\_\_\_  
 Date of issue \_\_\_\_\_  
 Valid upto \_\_\_\_\_

**CERTIFICATE OF MANUFACTURE IN RESPECT OF  
 PHYSICAL/GANULATED MIXTURE/ORGANIC FERTILISER/BIO-  
 FERTILISER**

\_\_\_\_\_  
 (Name of Manufacturer) is hereby given the certificate for manufacture  
 of the physical/granulated mixture/organic fertiliser/Bio-fertiliser specified below  
 subject to the terms and conditions of this certificate and to the provisions of the  
 Fertiliser (Control) Order, 1985.

Full particulars of the organic fertiliser/  
 biofertiliser

Full address of the premises where  
 the organic fertiliser/ Bio-fertiliser will  
 be made

Date:

Registering Authority:

Seal:

State:

Renewed upto \_\_\_\_\_

Date:

Registering Authority:

Seal:

State:

Terms and conditions of this certificate

- (1) The holder of this certificate shall display the original thereof in a conspicuous place open to the public in a part of the principal's premises in which business of making the physical/granulated mixture/organic fertiliser/biofertiliser is carried on and also a copy of such certificate in similar manner in every other premises in which that business is carried on. The required number of copies of the certificate shall be obtained on payment of the fees thereof.

- (2) The holder of this certificate shall not keep in the premises in which he carries on the business of making physical/granulated mixture of biofertilisers/organic fertiliser in respect of which a certificate of registration has not been obtained under the fertiliser (Control) Order, 1985.
- (3) The holder of this certificate shall comply with the provisions of the fertiliser (Control) Order, 1985 and the notification, order and direction, issued there under for the time being in force.
- (4) The holder of the certificate shall report forth with to the Registering Authority any change in the premises specified in the certificate or any new premises in which he carried on the business of making physical/granulated mixture/organic fertiliser/biofertiliser and shall produce before the authority the original certificate and copies thereof so that necessary corrections may be made therein by that authority.
- (5) The holder of this certificate shall ensure that the physical/granulated mixture/organic fertiliser/biofertiliser in respect of which a certificate of registration has been obtained is prepared by him or by a person having such qualifications, as may be prescribed by the State Government, from time to time or by any other person under the direction, supervision and control of the holder or the person having the said qualifications.
- (6) The certificate and copies thereof, if any, will be machine numbered and delivered against the signature of the holder thereof or his agent on the carbon copy of the certificate which will be kept intact bound in the "Certificate Book" by each Registering Authority."

18. In the said Order, after form J, the following form shall be inserted, namely :-

**"FORM 'J-1'**

[See clause 28 (bb)]

**FORM INDICATING PARTICULARS OF ORGANIC FERTILISER/ BIO-FERTILISERS SAMPLED**

- (1) Name and address of dealer/manufacturer/importer \_\_\_\_\_
- (1A) \*Certificate of Registration Number \_\_\_\_\_
- (2) Date of sampling \_\_\_\_\_
- (3) Details of markings of bags from where sample has been taken \_\_\_\_\_
- (i)\*Type organic fertiliser/ of Bio-fertiliser \_\_\_\_\_

- (ii) Name of manufacturer/importer \_\_\_\_\_
- (iii)\*Batch No. (if applicable) and date of manufacture/import \_\_\_\_\_
- (v) Composition \_\_\_\_\_
- (4) Date of receipt of the stock by the dealer/manufacturer/importer/pool handling agency \_\_\_\_\_
- (5) \*Code No. of sample \_\_\_\_\_
- (6) Stock position of the lot \_\_\_\_\_
- (7) Physical condition of organic fertiliser/ Bio-fertiliser \_\_\_\_\_
- (8) Whether samples drawn from open bags\*\* or stitched bags\*\*/with sealed packet \_\_\_\_\_
- (9) Name and Address of organic fertiliser/ Bio-fertiliser Inspector drawing sample \_\_\_\_\_

\*\*For organic fertiliser

Signature and Metallic Seal  
impression of Fertilizer Inspector

**Receipt of the dealer**

Certified that the sample of organic fertiliser/ Bio-fertiliser has been drawn in accordance with the procedure laid down in the fertiliser (Control) Order, 1985 from the stock in my possession, and I have signed the test samples at the time of wax sealing. I have also received one test sample out of the three test samples prepared.

Signature and Seal of Fertiliser Inspector

Signature of dealer/  
manufacture/importer/  
pool handling agency  
with address”

19. In the said Order, after Form K, the following form shall be inserted, namely :-

**“FORM ‘K-1’**

(See clause 30 )

**MEMORANDUM TO ACCOMPANY ORGANIC FERTILISER/BIO-FERTILISER SAMPLE FOR ANALYSIS**

No.

From

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

To,

In charge

Organic fertiliser/Bio-fertiliser Quality Control Laboratory

The Bio-fertiliser samples as per details given below are sent for analysis:-

- (1) \*Name of organic fertiliser/ Bio-fertilizer \_\_\_\_\_
  - (2) Date of sampling \_\_\_\_\_
  - (3) Physical condition of organic fertiliser/ Bio-fertiliser \_\_\_\_\_
  - (4) Code number of sample \_\_\_\_\_
- 2 The analysis report may be forwarded to \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Place:

Date:

Signature and metallic seal  
impression of Fertilizer Inspector”

20. In the said Order, after Form L, the following forms shall be inserted, namely :-

**“FORM ‘L – 1’**

(See clause 30 )

**ANALYSIS REPORT OF ORGANIC FERTILISER SAMPLE**

No. \_\_\_\_\_

Government of \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

(Name of the Laboratory)

Date \_\_\_\_\_  
To \_\_\_\_\_

The Fertiliser Inspector

The analysis report of the organic fertiliser sample forwarded vide your reference  
No. \_\_\_\_\_ Dated \_\_\_\_\_ is as per details  
given below:

- (1) Name of Organic fertiliser \_\_\_\_\_

- (2) Date of Sampling \_\_\_\_\_
- (3) Code No. of sample as indicated by  
by the Inspector \_\_\_\_\_
- (4) Date of receipt of the sample in the  
Laboratory \_\_\_\_\_
- (5) Laboratory sample No. \_\_\_\_\_
- (6) Date of analysis of sample \_\_\_\_\_
- (7) Analysis of Organic Fertiliser (on fresh weight basis)

| Sl.No. | Specification as per<br>FCO | Composition as<br>per analysis | Variation | Permissible<br>Tolerance<br>limit |
|--------|-----------------------------|--------------------------------|-----------|-----------------------------------|
| 1      | 2                           | 3                              | 4         | 5                                 |
|        |                             |                                |           |                                   |

(A) Physical Characteristics –

- (i) Moisture content \_\_\_\_\_  
 (ii) Bulk density \_\_\_\_\_  
 (iii) Particle size \_\_\_\_\_

(B) Chemical Characteristics –

- (i) Total Organic Carbon \_\_\_\_\_  
 (ii) Total Nitrogen \_\_\_\_\_  
 (iii) C:N \_\_\_\_\_  
 (iv) Phosphorus \_\_\_\_\_  
 (v) Potassium \_\_\_\_\_  
 (vi) pH \_\_\_\_\_  
 (vii) Conductivity \_\_\_\_\_

(C) Heavy Metal

- (i) Cadmium \_\_\_\_\_  
 (ii) Chromium \_\_\_\_\_  
 (iii) Copper \_\_\_\_\_  
 (iv) Mercury \_\_\_\_\_  
 (v) Nickel \_\_\_\_\_  
 (vi) Lead \_\_\_\_\_  
 (vii) Zinc \_\_\_\_\_

Remarks: The sample is/is not according to specification and fails in \_\_\_\_\_

**Signature of the Incharge  
(Testing Laboratory)**

**Copy to:-**

**Director of Agriculture**

**FORM 'L - 2'**

(See clause 30 )

**ANALYSIS REPORT OF BIO-FERTILISER SAMPLE**

**No.** \_\_\_\_\_

**Government of** \_\_\_\_\_

**(Name of the Laboratory)**

**Date** \_\_\_\_\_  
**To**

**The Fertiliser Inspector**

The analysis report of the organic fertiliser sample forwarded vide your reference No. \_\_\_\_\_ Dated \_\_\_\_\_ is as per details given below:

- (1) **Name of Biofertiliser** \_\_\_\_\_
- (2) **Date of Sampling** \_\_\_\_\_
- (3) **Code No. of sample as indicated by  
by the Inspector** \_\_\_\_\_
- (4) **Date of receipt of the sample in the  
Laboratory** \_\_\_\_\_

- (5) Laboratory sample No. \_\_\_\_\_
- (6) Date of analysis of sample \_\_\_\_\_
- (7) Analysis of Bio-fertiliser (on fresh weight basis)

| Sl.No. | Specification as per FCO<br>(Rhizobium, Azotobacter,<br>Azospirillum, PSM)  | Composition as<br>per analysis<br>(Rhizobium,<br>Azotobacter,<br>Azospirillum,<br>PSM) | Variation | Permissible<br>Tolerance limit |
|--------|---|--|-----------|--------------------------------|
| 1      | 2   | 3  | 4         | 5                              |
| (A)    | <b>Physical Characteristics:-</b><br>(i) Moisture content<br>(ii) Particle size   |  |           |                                |
| (B)    | <b>Chemical Characteristics:-</b><br>(i) pH   |  |           |                                |
| (C)    | <b>Microbial Characteristics:-</b><br>(i) Viable Cell Count<br>(ii) Contamination Level   |  |           |                                |
| (D)    | <b>Efficiency Characteristics:-</b><br>*(i) Nodulation Test<br>**(ii) Nitrogen fixed (mg)/g of sucrose consumed<br>***(iii) Formation of White pellicle in semi solid Nitrogen free bromothymol blue media<br>+(iv) (a) Solubilization zone (mm)<br>(b) P- phosphorus (%)<br>Spectrophotometer. |  |           |                                |

\* Rhizobium, \*\* Azotobacter, \*\*\* Azospirillum, + PSM

Remarks: The sample is/is not according to specification and fails in \_\_\_\_\_.

Signature of the Incharge  
(Testing Laboratory)"

Copy to:-

Director of Agriculture

[No. 9-23/2005-Org. Fing.]  
SATISH CHANDER, Jt. Secy.

**Note:- The Fertilizer (Control)Order, 1985 was published in the Gazette of India, vide number G.S.R. 758(E) dated the 25<sup>th</sup> September, 1985 and subsequently amended vide number:-**

1. G.S.R. 201(E) dated 14<sup>th</sup> February, 1986
2. G.S.R. 508(E) dated 19<sup>th</sup> March, 1986
3. G.S.R. 1160(E) dated 21<sup>st</sup> October, 1986
4. S.O 822(E) dated 14<sup>th</sup> September, 1987
5. S.O. 1079(E) dated 11<sup>th</sup> December, 1987
6. S.O .252(E) dated 11<sup>th</sup> March, 1988
7. S.O. 724(E) Dated 28<sup>th</sup> July, 1988
8. S.O. 725(E) dated 28<sup>th</sup> July, 1988
9. S.O. 940(E) dated 11<sup>th</sup> October, 1988
10. S.O. 498(E) dated 29<sup>th</sup> June, 1989
11. S.O. 581(E) dated 27<sup>th</sup> July, 1989
12. S.O. 673(E) dated 25<sup>th</sup> August, 1989
13. S.I. 738(E) dated 15<sup>th</sup> September. 1989
14. S.O. 140(E) dated 12<sup>th</sup> February, 1990
15. S.O. 271(E) dated 29<sup>th</sup> March, 1990
16. S.O. 403(E) dated 23<sup>rd</sup> May, 1990
17. S.O. 675(E) dated 31<sup>st</sup> August, 1990
18. S.O. 261(E) dated 16<sup>th</sup> April, 1991
19. S.O. 444(E) dated 2<sup>nd</sup> July, 1991
20. S.O. 530(E) dated 16<sup>th</sup> August, 1991
21. S.O. 795(E) dated 22<sup>nd</sup> November, 1991
22. S.O. 377(E) dated 29<sup>th</sup> May, 1992
23. S.O. 534(E) dated 20<sup>th</sup> July, 1992
24. S.O. 826(E) dated 9<sup>th</sup> November, 1992
25. S.O. 154(E) dated 3<sup>rd</sup> June, 1993
26. S.O. 397(E) dated 18<sup>th</sup> June, 1993
27. S.O. 942(E) dated 10<sup>th</sup> December, 1993
28. S.O. 163(E) dated 14<sup>th</sup> February, 1994
29. S.O. 340(E) dated 17<sup>th</sup> April, 1995
30. S.O. 459(E) dated 22<sup>nd</sup> May, 1995
31. S.O. 835(E) dated 12<sup>th</sup> October, 1995
32. S.O. 575(E) dated 20<sup>th</sup> August, 1996
33. S.O. 57(E) dated 22<sup>nd</sup> January, 1997
34. S.O. 329(E) dated 12<sup>th</sup> May, 1999
35. S.O. 1068(E) dated 4<sup>th</sup> Nov, 1999
36. S.O. 49(E) dated 16<sup>th</sup> Jan, 2003
37. S.O. 373(E) dated 1<sup>st</sup> April, 2003
38. S.O. 413 (E) dated 7<sup>th</sup> April, 2003
39. S.O. 540(E) dated 4<sup>th</sup> May, 2003
40. S.O. 342(E) dated 18th March, 2005.